

**Calciumphosphat-Hohlpartikel als Indikator einer  
supramolekularen Selbstorganisation  
von Aminosäuren in Wasser  
sowie die Herstellung  
von Silber-dotiertem Hydroxylapatit**

**D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

**Daniel Hagmeyer**

geboren in Essen



Fakultät für Chemie

Institut für Anorganische Chemie

März 2011

---

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2008 bis März 2011 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple  
Prof. Dr. Christian Mayer  
Vorsitzende: PD Dr. Ursula Telgheder  
Tag der Disputation: 17.05.2011

---

---

**Meinen Eltern  
und  
meiner Freundin  
Christiane**

*Alles wissenschaftliche Arbeiten ist nichts anderes, als  
immer neuen Stoff in allgemeine Gesetze zu bringen.*

*Wilhelm von Humboldt*

## **Inhalt**

1	Einleitung und Ziel der Arbeit .....	1
2	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1	Nanopartikel .....	3
2.1.1	Kolloidchemie .....	3
2.1.2	Hohlkugeln .....	7
2.1.3	Vesikel.....	7
2.2	Calciumphosphate .....	8
2.2.1	Calciumphosphatverbindungen.....	10
2.2.2	Hydroxylapatit.....	11
2.2.3	Silber-dotierter Hydroxylapatit .....	13
2.3	Aminosäuren .....	14
2.3.1	Glycin (Gly) .....	16
2.3.2	L-Alanin (Ala).....	16
2.3.3	L-Serin (Ser) und <i>O</i> -Phospho-L-Serin (SerP).....	17
2.3.4	L-Tyrosin (Tyr) und <i>O</i> -Phospho-L-Tyrosin (TyrP).....	18
2.4	Peptide .....	19
3	Verwendete Methoden .....	20
3.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	20
3.1.1	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) .....	20
3.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	21
3.2.1	Kryo-TEM.....	21



3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential .....	24
3.4 <i>Nanoparticle-Tracking-Analysis (NTA)</i> .....	25
3.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	26
3.6 Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS) .....	26
3.7 Infrarotspektroskopie (IR).....	27
3.8 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD).....	27
3.9 Thermogravimetrie (TG).....	29
3.10 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS).....	29
3.11 UV-Spektroskopie (UV-VIS).....	30
3.12 Größenausschlusschromatografie (SEC) .....	30
3.13 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) .....	31
3.14 Elementaranalyse (EA) .....	31
4 Durchführung .....	32
4.1 Herstellung von <i>O</i> -Phospho-L-Tyrosin.....	32
4.2 Herstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln .....	33
4.2.1 Temperaturstabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel .....	35
4.2.2 pH-Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel .....	35
4.2.3 Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel gegen Ultraschall .....	35
4.2.4 Analyse der Calciumphosphat-Hohlpartikel mittels UV/Vis- Spektroskopie .....	36
4.3 Aminosäuren in wässrigen Lösungen .....	37
4.3.1 Temperaturstabilität der Aminosäurevesikel .....	37
4.3.2 pH-Stabilität der Aminosäurevesikel .....	37

4.3.3 Verschiedene Trocknungsmethoden für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Aminosäuren .....	38
4.3.4 Analyse der Aminosäurevesikel mittels Größenausschlusschromatografie .....	38
4.3.5 Massenspektroskopie von <i>O</i> -Phospho-L-Tyrosin.....	39
4.3.6 Rasterkraftmikroskopie und Probenpräparation durch <i>Spin Coating</i>	39
4.3.7 Abschätzung der Aminosäuremenge in den Vesikeln .....	39
4.4 Herstellung von Silber-dotiertem Hydroxylapatit.....	40
4.4.1 Hochtemperaturphasen von Silber-dotiertem HAP .....	41
4.4.2 Silberfreisetzung aus Silber-dotiertem HAP .....	42
4.5 Verwendete Chemikalien .....	43
4.5 Verwendete Geräte .....	45
5 Ergebnisse und Diskussion.....	47
5.1 Calciumphosphat-Hohlpartikel .....	47
5.1.1 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von <i>O</i> - Phospho-L-Tyrosin (TyrP).....	47
5.1.2 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L- Tyrosin (Tyr) .....	74
5.1.3 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von <i>O</i> - Phospho-L-Serin (SerP) .....	79
5.1.4 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L- Serin (Ser).....	83
5.1.5 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L- Alanin (Ala).....	88

5.1.6 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart der Dipeptide Serin-Tyrosin (Ser-Tyr) und Alanin-Tyrosin (Ala-Tyr) .....	91
5.1.7 Zusammenfassung des Kapitels: Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von Aminosäuren und Dipeptiden .....	97
5.2 Aminosäuren in Wasser .....	100
5.2.1 Aminosäuren .....	100
5.2.2 Boc-Alanin-Lösung .....	131
5.2.3 Harnstoff-Lösung .....	133
5.2.4 Natriumacetat-Lösung .....	134
5.2.5 <i>para</i> -Aminosalicylsäure-Lösung (PAS) .....	136
5.2.6 Zusammenfassung des Kapitels: Aminosäuren in Wasser .....	138
5.3 Modell eines Bildungsmechanismus zur Bildung von Calciumphosphat- Hohlpartikeln.....	100
5.4 Silber-dotierter Hydroxylapatit .....	143
5.4.1 Freisetzung von Silber aus dem Silber-dotierten Hydroxylapatit....	155
5.4.2 Die antibakterielle Wirkung von Silber-Hydroxylapatit.....	164
5.4.3 Die Wirkung von Silber-dotiertem HAP auf Zellen .....	166
5.4.4 $\beta$ -TCP und $\alpha$ -TCP hergestellt aus Silber-dotiertem Hydroxylapatit	170
5.4.5 Zusammenfassung des Kapitels: Silber-dotierter Hydroxylapatit ...	176
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	178
7 Literatur .....	180
8 Abkürzungsverzeichnis .....	190
9 Publikationsliste .....	192
10 Lebenslauf .....	194

---

---

## *Inhalt*

11 Erklärung .....	195
12 Danksagung .....	196

## **1 Einleitung und Ziel der Arbeit**

Calciumphosphate spielen als Hydroxylapatit (HAP) oder  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) in der Medizin eine große Rolle. Der größte Teil des menschlichen Hartgewebes in Form von Knochen und Zähnen besteht aus Hydroxylapatit.<sup>[1, 2]</sup>

Anwendung finden Calciumphosphate in der Medizin als Knochenersatzmaterial, als Beschichtungen von Osteosyntheseimplantaten oder als Nanopartikel-Trägersystem für Medikamente, DNA sowie RNA.<sup>[1-6]</sup>

Als ein weiteres Trägersystem finden Hohlpartikel aus unterschiedlichsten Materialien wie Calciumphosphaten, Calciumcarbonat oder aus Polymeren Verwendung.<sup>[7-13]</sup>

GANESAN zeigte in seiner Dissertation, dass sich aus Calciumphosphat-Nanopartikeln in Gegenwart von *O*-Phospho-L-Tyrosin spontan Hohlpartikel aus den vorher hergestellten Calciumphosphatnanopartikeln bilden.<sup>[14]</sup>

Ein Ziel dieser Arbeit war es, diesen spontanen Selbstanordnungsmechanismus zu klären, dazu wurden weitere Aminosäuren und Dipeptide verwendet. Zur Charakterisierung der entstandenen Hohlpartikel und zur Aufklärung des Bildungsmechanismus kamen diverse analytische Methoden wie die Dynamische Lichtstreuung (DLS), die *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), die Rasterelektronenmikroskopie (REM), die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS) zur Anwendung.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war es, einen antibakteriellen Hydroxylapatit durch Einbringen von Silberionen in das Kristallgitter herzustellen, um die antibakterielle Wirkung von Silberionen auszunutzen.<sup>[15-19]</sup>

Im medizinischen Alltag kommt es leider sehr oft zu bakteriellen Infektionen an Osteosyntheseimplantaten. Die antibakterielle Wirkung der Silberionen soll verhindern, dass es zu Entzündungsreaktionen an den Implantaten kommt. Einer der größten Infektionspunkte entsteht bei der Implantation von Stifzähnen im Mund- und Kiefer-Bereich.<sup>[20-24]</sup>

Die entzündeten Implantate müssen dann wieder explantiert werden, was zu sehr hohen Belastungen durch weitere Operationen für den Patienten führt. Nicht außer Acht zu lassen sind auch die dadurch entstehenden sehr hohen Folgekosten.<sup>[25-27]</sup>

Status Quo in der Medizin ist im Moment die Verabreichung und Beimengung von Antibiotika, welche jedoch oft Nebenwirkungen haben und in einigen Fällen durch Ausbildung von Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum wirkungslos bleiben.<sup>[28-35]</sup>

Im Gegensatz zu dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verfahren, zur Herstellung von Silber-dotiertem Hydroxylapatit, sind die meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren keine kontinuierlichen Verfahren, des Weiteren werden gemäß Literatur sehr oft Silbernanopartikel dem Hydroxylapatit beigemischt.<sup>[36-41]</sup>

Zur Charakterisierung des Silber-dotierten Hydroxylapatits wurden verschiedene Methoden verwendet. So kamen Methoden wie XRD, REM, TG, IR-Spektroskopie, AAS, UV/Vis-Spektroskopie und Elementaranalyse zur Anwendung. Um zu sehen, wie viel Silber aus dem Silber-dotierten HAP freigesetzt wird, wurden Freisetzungskurven mit Hilfe der Dialyse erstellt. Ob der Silber-dotierte Hydroxylapatit eine antibakterielle Wirkung hat, wurde an *E. coli* Bakterien getestet.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Nanopartikel

Das Wort Nano leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet soviel wie Zwerg. Die Definition der Größe von Nanopartikeln ist sehr unterschiedlich, so schwanken die Angaben zwischen 1 nm bis 100 nm oder bis 500 nm.<sup>[42, 43]</sup> Wenn Nanopartikel in Wasser sehr fein verteilt sind, so spricht man von einem kolloidalen System.<sup>[42]</sup> Nanopartikel besitzen im Vergleich zur *Bulkphase* eine sehr viel größere spezifische Oberfläche und haben daher oft andere chemische und physikalische Eigenschaften.<sup>[43]</sup>

#### **2.1.1 Kolloidchemie**

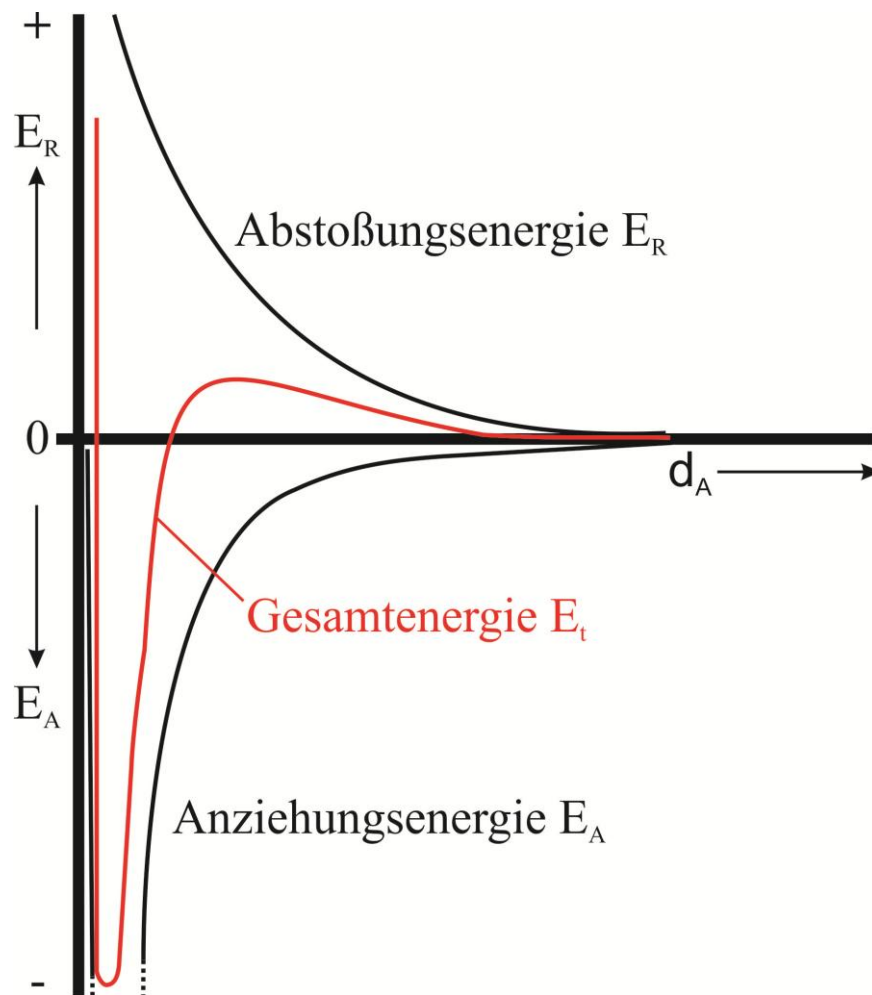
Der Wissenschaftler THOMAS GRAHAM führte als Erster den Begriff des Kolloids ein. Kolloide sind nach Grahams Definition Stoffe in Lösung, die nicht membrangängig sind. Das kolloidale System unterteilt sich in zwei Phasen, in die disperse und die kontinuierliche Phase. Die disperse Phase wird in der kontinuierlichen Phase fein verteilt, daher nennt man die kontinuierliche Phase auch Dispersionsmittel. Beide Phasen können in allen drei Aggregatzuständen vorkommen. In **Tabelle 1** sind einige Beispiele kolloidaler Systeme angegeben.<sup>[42]</sup>

**Tabelle 1:** Verschieden kolloidale Systeme (entnommen aus<sup>[42]</sup>).

<b>Beispiel</b>	<b>Klasse</b>	<b>Disperse Phase</b>	<b>Dispersionsmittel</b>
Nebel, Dunst	flüssige Aerosole	Flüssigkeit	Gas
Rauch	feste Aerosole	Feststoff	Gas
Butter, Creme	Emulsion	Flüssigkeit	Flüssigkeit
Farbe, Lacke	kolloidale Dispersion	Feststoff	Flüssigkeit
Opalglas	feste Suspension	Feststoff	Feststoff
Schäume	Schaum	Gas	Flüssigkeit
Schaumstoffe	fester Schaum	Gas	Feststoff

### 2.1.1.1 Die DLVO-Theorie

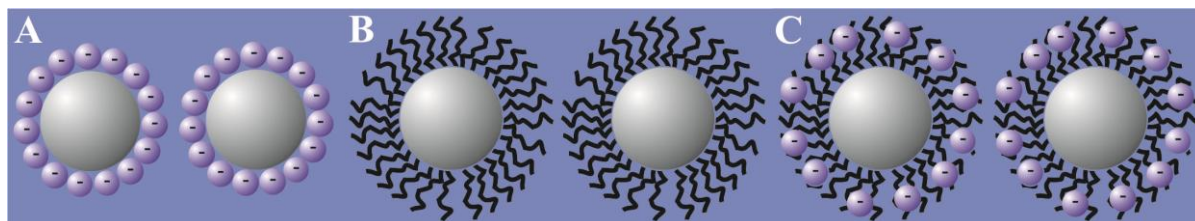
Dispergierte Kolloide sind thermodynamisch instabil, da sie eine metastabile Phase bilden. Die Stabilität der dispergierten Nanopartikel wird über die DLVO-Theorie beschrieben. In dieser wird die Wechselwirkung von Kolloiden beschrieben, hier gibt es attraktive und repulsive Wechselwirkungen. Die Wechselwirkung zwischen Kolloiden ist die Summe von Abstoßungs- und Anziehungskräften. Sind die Anziehungskräfte größer als die Abstoßungskräfte, so ist das System instabil und es kommt zur Agglomeration der Kolloide, was in **Abbildung 1** grafisch dargestellt ist.



**Abbildung 1:** Potentialkurven der Wechselwirkungen von Kolloiden (entnommen aus<sup>[42]</sup>).



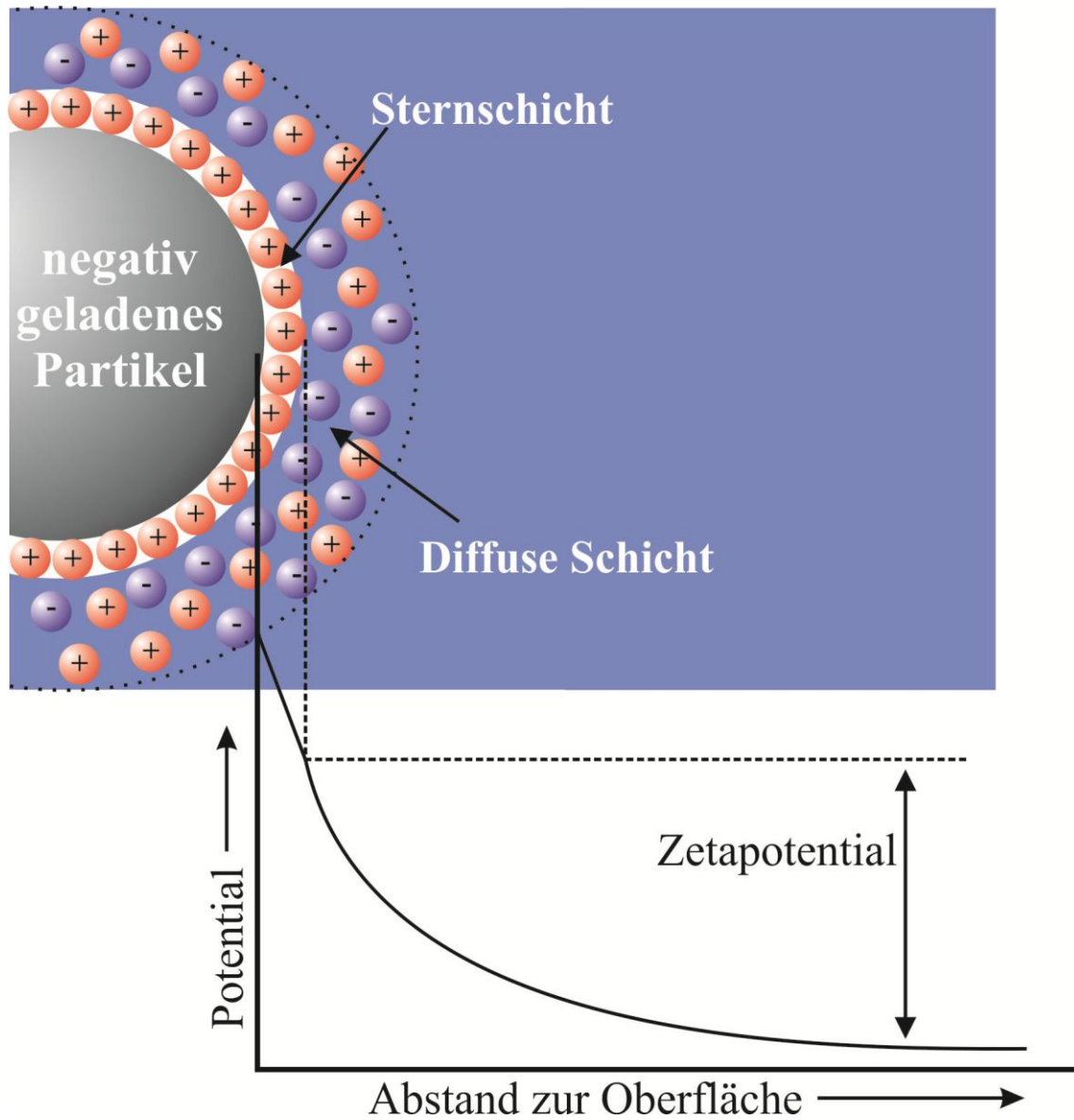
Das Partikelsystem kann durch zwei bzw. drei Faktoren stabilisiert werden. Die erste Möglichkeit ist die sterische Stabilisierung der Kolloide, z. B. mit einem sterisch anspruchsvollen Polymer. Die zweite ist die elektrostatische Stabilisierung der Partikel, und die dritte ist eine Mischung aus sterischer und elektrostatischer Stabilisierung. In **Abbildung 2** sind die drei Stabilisierungsmöglichkeiten noch einmal grafisch dargestellt.<sup>[42]</sup>



**Abbildung 2:** Stabilisierungsformen von Kolloiden A) elektrostatische, B) sterische, C) elektrosterische Stabilisierung (entnommen aus<sup>[42]</sup>).

### 2.1.1.2 Das Zetapotential

Als Zetapotential wird das elektrische Potential an der Scherschicht eines Nanopartikels bezeichnet. Bei dispergierten Nanopartikeln in einem flüssigen Medium bildet sich an der Oberfläche der Partikel eine Oberflächenladung aus. Durch die Anlagerung von Gegenionen an die Oberflächenladung der Partikel wird diese kompensiert, und es bildet sich eine elektrostatische Doppelschicht aus. Die ausgebildete Doppelschicht besteht aus einer starren stark gebundenen Sternschicht und aus einer diffusen äußeren Schicht, was in **Abbildung 3** gezeigt ist. Bewegt sich ein Partikel in Lösung, so bewegen sich die Ionen mit, und es entsteht zwischen Sternschicht und diffuser Schicht ein Potentialabfall. Die Differenz der Potentiale wird als Zetapotential bezeichnet.<sup>[42, 44]</sup> In **Abbildung 3** sind der Potentialabfall und das daraus resultierende Zetapotential grafisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Zetapotentials (entnommen aus<sup>[42]</sup>).

### 2.1.2 Hohlkugeln

Für die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Nanopartikeln ist nicht nur die Größe ausschlaggebend; so haben Hohlpartikel eine geringere Dichte, einen kleineren thermischen Ausdehnungskoeffizienten und einen niedrigeren Brechungsindex.<sup>[45]</sup>

Es sind von vielen Materialien Hohlpartikel bekannt, so gibt es metallische Hohlpartikel aus Kupfer und Gold. Weiter sind oxidische Hohlpartikel aus Magnesiumoxid oder aus Kupferoxid bekannt, des weiteren werden auch Calciumcarbonat-Hohlpartikel dargestellt.<sup>[11, 45-50]</sup> Zur Herstellung von Hohlpartikeln gibt es die Möglichkeiten der *conventional hard-templating synthesis*, der *sacrificial templating synthesis*, der *soft-templating synthesis* und der *template-free synthesis*.<sup>[45]</sup>

Mikroskopische und nanoskopische Hohlpartikel aus Calciumphosphat sind aufgrund ihrer guten Biokompatibilität als Wirkstoffträgersystem von Bedeutung.<sup>[8, 51-57]</sup> Hohle Calciumphosphat-Partikel werden typischerweise nach dem *hard-templating*- oder dem *template-free*-Verfahren hergestellt.<sup>[58-60]</sup>

### 2.1.3 Vesikel

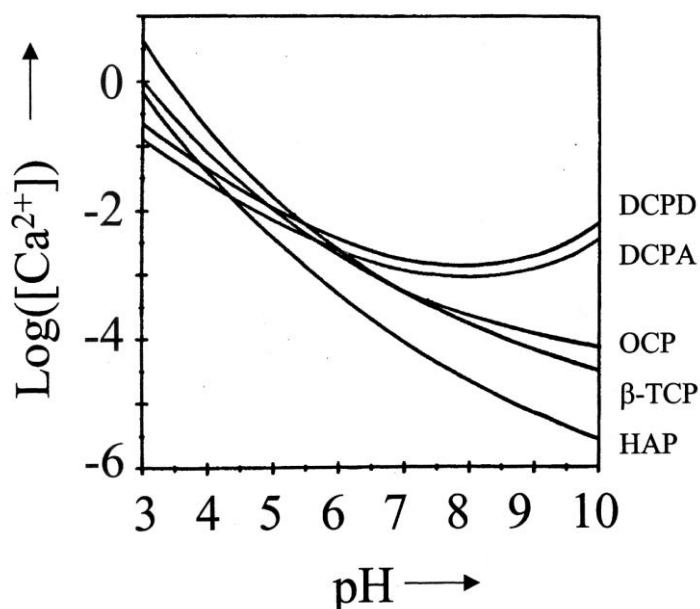
Das Wort Vesikel leitet sich aus dem Lateinischen für Bläschen ab. Durch die Selbstorganisation von Molekülen zu großen Aggregaten können Micellen, *Bilayer* oder Vesikel entstehen. Die natürlichen Stoffe, die Vesikel bilden, sind amphiphile Lipide. Die meisten Vesikel bestehen aus einer Doppelschicht und bilden somit eine Membran aus. Auch Zwitterionen können Vesikel ausbilden. In der Natur dienen Vesikel als Transportverpackung, z. B. für Enzyme oder Hormone. Vesikel können auch als Templat zur Herstellung von Nanopartikeln nach der *Layer-by-Layer*-Methode verwendet werden.<sup>[61-64]</sup>

## 2.2 Calciumphosphate

Calciumphosphat kommt in vielen Phasen vor, so gibt es z.B. Calciumdihydrogenphosphat, Calciumhydrogenphosphat, Calciumphosphat, Tetra-calciumphosphat, Octacalciumphosphat und Hydroxylapatit.<sup>[2, 63]</sup>

Diese große Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Calcium, Phosphat und Wasser ist auf die verschiedenen Protolysegrade der Phosphorsäure zurückführen.<sup>[2, 63]</sup>

Die Löslichkeit von Calciumphosphaten ist vom pH-Wert abhängig. Die meisten Calciumphosphate sind in Wasser schwer löslich bis unlöslich, jedoch in verdünnten Säuren gut löslich.



**Abbildung 4:** pH-abhängige Löslichkeit von Calciumphosphaten (entnommen aus<sup>[2]</sup>).

In **Abbildung 4** ist die logarithmierte Gesamt-Calciumkonzentration ( $\text{mol L}^{-1}$ ) in Lösung gegen den pH-Wert der Lösung bei 25 °C aufgetragen. Die Löslichkeitsprodukte der einzelnen Calciumphosphate sind in **Tabelle 2** dargestellt.<sup>[2]</sup>

Um die Calciumphosphatverbindungen schnell und einfach benennen zu können, wurden folgende Abkürzungen eingeführt.<sup>[2]</sup>

**Tabelle 2:** Abkürzungen der Calciumphosphatverbindungen, Ca/P-Verhältnis (entnommen aus<sup>[2]</sup>).

Verbindung	Abkürzung	Summenformel	molares Ca/P- Verhältnis	Löslichkeit bei 25°C / -log( $K_{sp}$ )
Monocalciumphosphat-Monohydrat	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	1,14
Monocalcium-phosphat-Anhydrit	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	1,14
Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0	6,59
Dicalciumphosphat-anhydrit (Monetite)	DCPA	$\text{CaHPO}_4$	1,0	6,90
Octacalciumphosphat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,33	96,6
$\alpha$ -Tricalciumphosphat	$\alpha$ -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5
$\beta$ -Tricalciumphosphat	$\beta$ -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9
Amorphes Calcium-phosphat	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$	1,2-2,5	ca. 25-33
Tetracalciumphosphat	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	38-44
Hydroxylapatit	HA/HAP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	116,8
Calciumdefizitärer HA	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	1,5-1,67	ca. 85

Viele Calciumphosphate finden in der Biomedizin als Knochenersatzstoffe oder als Beschichtungen von chirurgischen Stählen für eine höhere Biokompatibilität Anwendung.<sup>[2, 63]</sup> Eine weitere Anwendung sind Calciumphosphat-Nanopartikel als Wirkstoffträgersystem oder zur Transfektion von Zellen.<sup>[3, 4, 65]</sup>

Calciumphosphate können synthetisch durch Fällungsverfahren oder aus biologischen Quellen gewonnen werden.<sup>[2]</sup>

### 2.2.1 Calciumphosphatverbindungen

**OCP** hat eine strukturell ähnliche Form wie Hydroxylapatit und tritt häufig als Zwischenphase beim Ausfällen von HAP oder CDHA auf. OCP ist sehr wahrscheinlich auch ein Zwischenprodukt bei der Entstehung von Biomineralien *in vivo*, da es in vielen biologischen Apatiten nachgewiesen werden kann. OCP kommt auch in Zahnstein und Blasensteinen vor.<sup>[1, 2]</sup>

**β-TCP** kann auch als *ortho*-Calciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) bezeichnet werden und ist gemeinhin unter dem Begriff Calciumphosphat bekannt. Hergestellt wird β-TCP z. B. aus CDHA durch Calcinieren oberhalb 800 °C. Wenn β-TCP über 1125 °C erhitzt wird, so entsteht die Hochtemperaturphase α-TCP. β-TCP ist bei Raumtemperatur die stabilere Phase. Die magnesiumhaltige Form von β-TCP (Whitlockit) findet man in vielen biologischen bzw. pathologischen Geweben, zum Beispiel in Blasensteinen, Speicheldrüsensteinen, arthritischem Knorpel oder Verkalkungen des Weichgewebes. Whitlockit konnte auch bei der Kariesbildung nachgewiesen werden. Medizinisch findet β-TCP in reiner Form sowie als Gemisch mit HAP Anwendung als Knochenersatzstoff.<sup>[1, 2]</sup>

**α-TCP** wird wie oben beschrieben durch Erhitzen von β-TCP gewonnen. α-TCP kommt nicht in biologischen Verkalkungen vor und wird in der Medizin nur für Calciumphosphatzemente verwendet.<sup>[1, 2]</sup>

**ACP** entsteht häufig als erstes Produkt bei der Calciumphosphatfällung aus wässrigen Lösungen. Die Zusammensetzung des ACP ist abhängig vom pH-Wert und der Konzentration der Calcium- und Phosphatlösungen. Im Röntgenpulverdiffraktogramm ist ACP amorph, jedoch findet man bei raster-elektronenmikroskopischen Untersuchungen sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 20-200 nm. Biologisch kommt ACP oft mit Fremdionen wie  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  oder  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  in pathologischen Verkalkungen von Weichgeweben

wie zum Beispiel von Herzklappen vor. Die medizinische Anwendung beschränkt sich auf die Verwendung in Calciumphosphat-Zementen.<sup>[1, 2]</sup>

### 2.2.2 Hydroxylapatit

Apatite sind Calciumphosphate mit der allgemeinen Summenformel  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  ( $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}$  oder  $\text{OH}$ ). Durch den Einbau von Fluorid, Chlorid oder Hydroxid können verschiedene Formen von Apatit erzeugt werden. So entstehen Fluorapatit, Chlorapatit oder Hydroxylapatit. Die Apatite neigen zu nicht-stöchiometrischen Zusammensetzungen aufgrund der verschiedenen Protolysegrade der Phosphorsäure.<sup>[1, 2, 63]</sup> Wenn HAP in chemisch reiner Form vorliegt, so ist er monoklin. Bei Temperaturen höher als 250 °C wandelt sich die monokline Modifikation in die hexagonale Modifikation um. Die kristallografischen Daten sind in **Tabelle 3** angegeben.

**Tabelle 3:** Kristallografische Daten von HAP (entnommen aus<sup>[2]</sup>).

Raumgruppe	Elementarzelldaten	Dichte / $\text{g cm}^{-3}$
monoklin $P2_1/b$	$a = 9,84214 \text{ \AA}, b = 2a \text{ \AA}, c = 6,8814 \text{ \AA}, \gamma = 120^\circ$	3,16
hexagonal $P6_3/m$	$a = b = 9,4302 \text{ \AA}, c = 6,8911 \text{ \AA}, \gamma = 120^\circ$	

In der Natur findet man nur die hexagonale Struktur von HAP, da diese Form des HAP durch Fremdionen auch bei Raumtemperatur stabilisiert wird.<sup>[1, 2]</sup> Im natürlichen HAP werden viele Fremdionen wie  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{CO}_3^{2-}$  anstelle des Hydroxids in die Kristallstruktur eingebaut. Es können auch Fremdionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$  anstelle des Calciums in das Kristallgitter eingebaut werden.<sup>[1, 2]</sup>

In der reinen Form sind Apatite weiße Festkörper, wobei die in der Natur vorkommenden Apatite meist durch Einlagerung von Übergangsmetallionen in die

Kristallstruktur farbig sind.<sup>[1, 2, 66]</sup> Hydroxylapatit ist der Hauptbestandteil von Knochen. HAP sowie Fluorapatit sind Bestandteile des Zahnschmelzes.

HAP kann auch in mikrokristalliner Form durch Festkörperreaktion hergestellt werden. In der Biomedizin findet Hydroxylapatit aufgrund seiner großen biologischen Ähnlichkeit zum natürlichen Knochenmineral ein großes Anwendungsspektrum. So werden Metallimplantate für eine höhere Biokompatibilität mit HAP beschichtet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass aus HAP Knochenersatzmaterialien hergestellt werden. Ein weiteres Anwendungsspektrum für HAP liegt in der Flüssigkeitschromatografie, wo HAP als stationäre Phase zum Trennen von Proteinen benutzt wird.<sup>[2]</sup>

HAP kann mit Hilfe einer kontinuierlichen Fällung durch Zusammengabe von Calcium- und Phosphatlösungen hergestellt werden. Durch die Fällungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Verweilzeit kann die Kristallinität von amorph über nanokristallin bis kristallin eingestellt werden.<sup>[67-70]</sup> Die Kristallinität des HAP nimmt mit steigender Temperatur und Verweilzeit im Reaktionsgefäß zu.<sup>[67, 70]</sup> Die mittlere Verweilzeit kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$t = V / \frac{DV}{Dt} \quad [69] \quad (1)$$

mit:

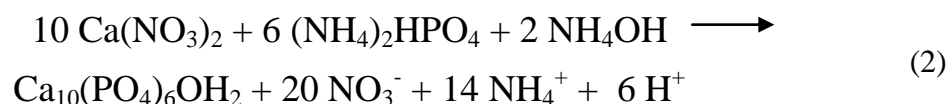
$t$  = mittlere Verweilzeit / min;  $V$  = Volumen des Reaktionsgefäßes / mL und  $DV / Dt$  = Zuflussgeschwindigkeit mL min<sup>-1</sup>

Bei der Fällung von HAP ist CDHA eine Phase, die durch das Fällen von Calciumphosphat aus neutralen oder basischen Lösungen entsteht. Durch Tempern von CDHA wandelt es sich in  $\beta$ -TCP und HAP um. Das Produkt, das



durch das Tempern entsteht, ist von der stöchiometrischen Zusammensetzung des Niederschlages abhängig.<sup>[2]</sup>

Die Musterreaktionsgleichung für die Synthese von HAP lautet:



### 2.2.3 Silber-dotierter Hydroxylapatit

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, können im Hydroxylapatit neben den natürlich vorkommenden Fremdionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  auch weitere Fremdionen wie zum Beispiel  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$  in das Hydroxylapatit-Kristallgitter eingebaut werden.<sup>[1, 2, 66, 71-78]</sup>

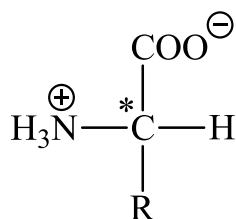
Durch die antibakterielle Wirkung von Silber ist es von großem Interesse, Silber in Form von Silbernanopartikeln oder Silberionen als Fremdion dem HAP beizumengen bzw. den HAP damit zu dotieren.<sup>[41, 79-81]</sup>

Wie oben schon beschrieben, gibt es mehr Möglichkeiten, Silber dem Hydroxylapatit beizufügen. Die erste Möglichkeit besteht darin, Silber in Form von Silberoxid mit Hydroxylapatit zu vermengen.<sup>[41]</sup> Ein weiteres Herstellungsverfahren funktioniert durch das Elektrospray-Verfahren.<sup>[38]</sup> Weitere Möglichkeiten sind die Herstellung von Silber-Hydroxylapatit durch ein Sol-Gel-Verfahren, sowie das Fällern von Hydroxylapatit in Gegenwart von  $\text{Ag}^+$ -Ionen.<sup>[17]</sup> Mit letzterem Verfahren lassen sich bis zu 3 % Silberionen in das HAP-Kristallgitter einbauen, darüber liegt Silber als  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  vor.<sup>[16, 40, 81]</sup>

Diese antibakteriellen Silber-Apatite sollen Anwendung im klinischen Alltag bei Implantaten finden, da es sehr oft zu bakteriellen Infekten an den bisherigen Osteosyntheseimplantaten kommt.<sup>[16, 82, 83]</sup>

## 2.3 Aminosäuren

Aminosäuren gehören zu den wichtigsten Verbindungen im menschlichen wie auch tierischen Organismus.<sup>[84, 85]</sup> Dort übernehmen sie verschiedene Funktionen, wie zum Beispiel als Proteinbausteine, Stoffwechselzwischenprodukte oder auch als Lieferant für biologisch aktive Verbindungen.<sup>[84]</sup> Der allgemeine strukturelle Aufbau der Aminosäuren besteht aus dem  $\alpha$ -C-Atom, an das eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe gebunden sind. Bis auf Glycin besitzen alle Aminosäuren noch eine Seitengruppe. Die proteinogenen Aminosäuren sind alle L-konfiguriert.<sup>[63, 84-86]</sup> In **Abbildung 5** ist der prinzipielle Aufbau einer Aminosäure dargestellt. R steht stellvertretend für die Seitenkette der Aminosäure, und das mit dem Stern gekennzeichnete C-Atom stellt das chirale  $\alpha$ -C-Atom dar.



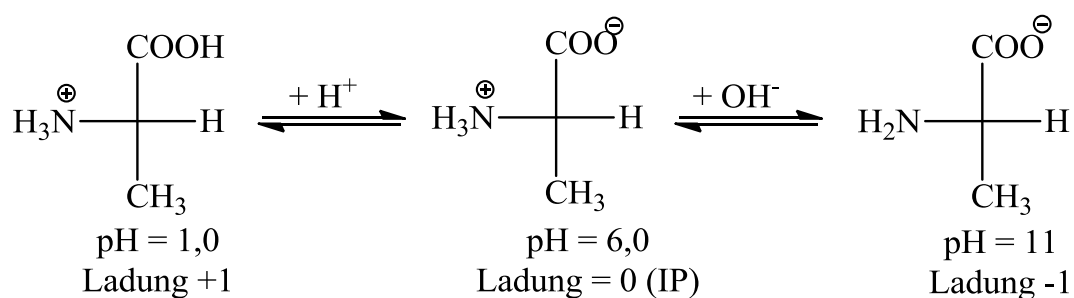
**Abbildung 5:** Prinzipieller Aufbau einer Aminosäure.

Die Seitenketten der Aminosäuren sind für ihre spezifischen Eigenschaften verantwortlich, so werden apolare, ungeladene polare und geladene polare Seitenketten unterschieden.<sup>[84]</sup> Die Carboxyl- sowie Aminogruppe der Aminosäuren sind sehr leicht ionisierbar. Die  $\text{pK}_s$ -Werte der Carboxylgruppe liegen bei ca. 2,2, die der Aminogruppe bei ca. 9,4. Das heißt, dass unter physiologischen Bedingungen die Aminosäure als Zwitterion vorliegt.<sup>[85]</sup> Von der Beschaffenheit der Seitenkette hängt auch die Löslichkeit der Aminosäure in Wasser ab; sie korreliert mit deren Polarität.

Weiter können die Aminosäuren in proteinogene und nicht proteinogene Aminosäuren unterteilt werden. Die proteinogenen Aminosäuren dienen zum Protein- und Enzymbau, während die nicht proteinogenen Aminosäuren in den Stoffwechsel eingebunden sind.<sup>[63, 84, 85]</sup>

Eine weitere Unterscheidung der 20 proteinogenen Aminosäuren kann in essenziell, bedingt essenziell und nicht essenziell vorgenommen werden. Die Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sind essenziell und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Bedingt essenziell sind Histidin und Arginin. Alle weiteren Aminosäuren können vom Organismus selber hergestellt werden.<sup>[87]</sup>

Wie oben schon beschrieben, können die Amino- sowie die Carboxylgruppe leicht protoniert bzw. deprotoniert werden, des Weiteren können auch dissoziierbare Seitenketten protoniert bzw. deprotoniert werden. Aus dieser Eigenschaft ergibt sich auch der isoelektrische Punkt (IP), an dem die Aminogruppe protoniert und die Carboxylgruppe deprotoniert vorliegen. Der IP ist definiert als der Punkt, an dem die Ladung der Aminosäure gleich Null ist.

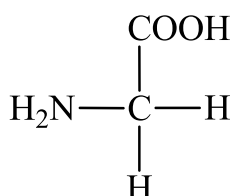


**Abbildung 6:** Ladungszustände am Beispiel von Alanin in Abhängigkeit des pH-Wertes (entnommen aus<sup>[84]</sup>).

Der isoelektrische Punkt von Aminosäuren berechnet sich aus dem Mittelwert der pK-Werte. Besitzt die Aminosäure eine saure oder basische Seitenkette, so verschiebt sich der isoelektrische Punkt in die entsprechende Richtung.<sup>[84, 85, 87]</sup>

### 2.3.1 Glycin (Gly)

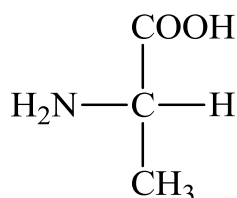
Glycin ist die einfachste proteinogene Aminosäure und ist nicht-essenziell. Im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren ist Glycin nicht chiral, da es am  $\alpha$ -C-Atom keine Seitenkette besitzt. Die  $pK_s$ -Werte lauten 2,34 (COOH) und 9,60 (NH<sub>2</sub>), daraus ergibt sich ein IP von 5,97. Die Löslichkeit von Glycin ist mit 225 g L<sup>-1</sup> recht hoch.<sup>[63, 84, 85]</sup> In **Abbildung 7** ist die Struktur von Glycin gezeigt.



**Abbildung 7:** Strukturformel von Glycin.

### 2.3.2 L-Alanin (Ala)

Alanin ist die zweiteinfachste proteinogene Aminosäure und wie Glycin nicht-essenziell. Alanin kommt in nahezu allen Proteinen vor. Der Anteil von Alanin in Proteinen liegt im Durchschnitt bei 9 %. Die Seitenkette am  $\alpha$ -C-Atom ist eine Methylgruppe. Die  $pK_s$ -Werte lauten 2,35 (COOH) und 9,87 (NH<sub>2</sub>), daraus folgt ein IP von 6,00 wie in **Abbildung 6** gezeigt. Die Wasserlöslichkeit von Alanin ist mit 160 g L<sup>-1</sup> kleiner als die von Glycin. In **Abbildung 8** ist die Struktur von Alanin gezeigt.



**Abbildung 8:** Strukturformel von Alanin.

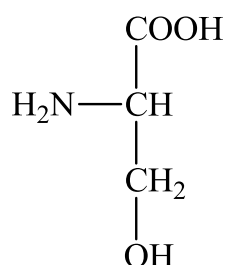
### 2.3.3 L-Serin (Ser) und O-Phospho-L-Serin (SerP)

Serin ist eine nicht essenzielle proteinogene Aminosäure mit einer Hydroxy-Seitenkette. O-Phospho-L-Serin (SerP) ist die phosphorylierte Variante von Serin. Die Phosphorylierung findet an der Hydroxy-Gruppe statt. In **Abbildung 9** sind die Strukturen der Aminosäuren dargestellt. In **Tabelle 4** finden sich die  $pK_s$ -Werte der beiden Aminosäuren. Der isoelektrische Punkt von Serin liegt bei 5,68. Serin kommt in Proteinen zu ca. 7% vor. Die Wasserlöslichkeit von Serin ist mit  $360 \text{ g L}^{-1}$  sehr hoch. Serin stabilisiert die 3D-Struktur von Proteinen und spielt in diesem Bereich eine wichtige Rolle.<sup>[63, 84, 85]</sup> SerP kommt in den nicht-kollagenen Knochenmatrixproteinen *bone sialoprotein* (BSP) und *osteopontin* (OPN) vor. Dort ist es für die spezifische Wechselwirkung von Knochenmatrix-Proteinen und HAP verantwortlich.<sup>[88, 89]</sup>

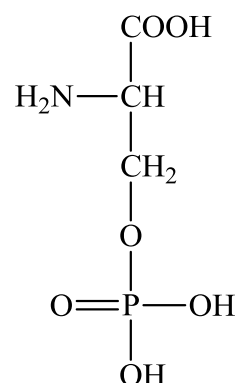
**Tabelle 4:**  $pK_s$ -Werte von Ser und SerP (entnommen aus<sup>[63, 90, 91]</sup>).

Gruppe	$pK_s$ -Werte Ser	$pK_s$ -Werte SerP
COOH	2,21	2,08
NH <sub>2</sub>	9,15	9,74
OH	-	-
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	-	< 1
PO <sub>4</sub> H <sup>-</sup>	-	5,65

A



B



**Abbildung 9:** Strukturformeln von A) Serin und B) O-Phospho-L-Serin.

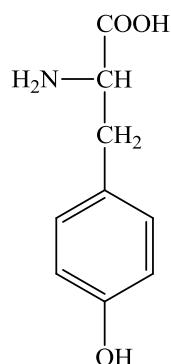
### 3.2.4 L-Tyrosin (Tyr) und O-Phospho-L-Tyrosin (TyrP)

Tyrosin gehört zu den bedingt essenziellen proteinogenen Aminosäuren, da es aus Phenylalanin hergestellt werden kann. Phenylalanin ist hingegen eine essenzielle Aminosäure. Tyrosin besitzt eine phenolische Seitenkette und ist mit  $0,38 \text{ g L}^{-1}$  sehr gering in Wasser löslich. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,65. In **Tabelle 5** sind die  $\text{pK}_s$ -Werte von Tyrosin sowie von O-Phospho-L-Tyrosin angegeben. O-Phospho-L-Tyrosin ist die phosphorylierte Variante von Tyrosin und wird durch die Tyrosin-Kinase im Organismus hergestellt.<sup>[63, 84, 85]</sup> Tyrosin und TyrP haben Einfluss auf die Reaktion von Insulin im Organismus, sowie dass Zellwachstum, indem die relevanten Wachstumsfaktoren reguliert werden. Tyrosin-Kinase-Hemmer werden auch als Antitumorreagenzien erforscht.<sup>[92-94]</sup> In **Abbildung 10** sind die Strukturen der Aminosäuren abgebildet.

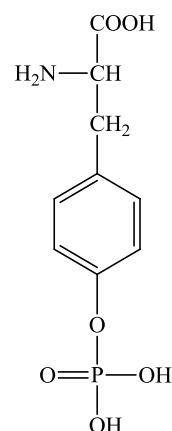
**Tabelle 5:**  $\text{pK}_s$ -Werte von Tyr und TyrP (entnommen aus:<sup>[85, 90]</sup>).

Gruppe	$\text{pK}_s$ -Werte Tyr	$\text{pK}_s$ -Werte TyrP
COOH	2,2	2,02
NH <sub>2</sub>	9,11	9,2
OH	10,11	-
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	-	1,6
PO <sub>4</sub> H <sup>-</sup>	-	5,65

A



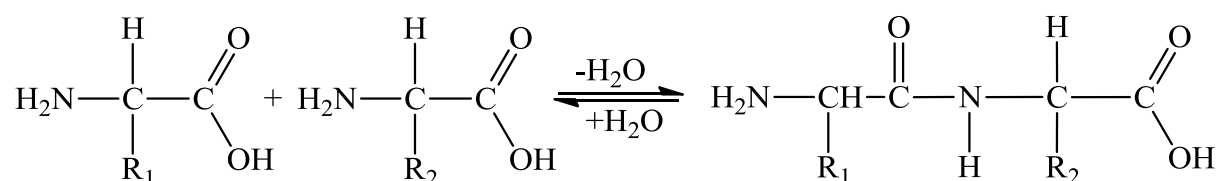
B



**Abbildung 10:** Strukturformeln von A) Tyrosin und B) O-Phospho-L-Tyrosin.

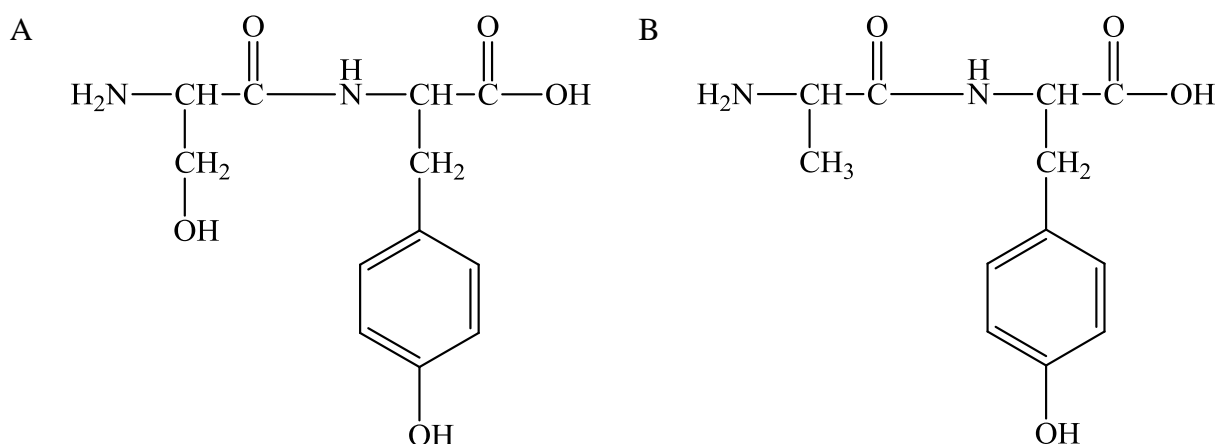
## 2.4 Peptide

Peptide bauen sich aus den 20 proteinogenen Aminosäuren auf. Durch eine Kondensationsreaktion zweier Aminosäuren entsteht ein Dipeptid. Der Aufbau von Peptiden ist kettenförmig, und sie besitzen alle das gleiche Rückgrat. In **Abbildung 11** ist die Synthese eines Dipeptids schematisch dargestellt.<sup>[84, 85]</sup>



**Abbildung 11:** Reaktion von zwei Aminosäuren zu einem Dipeptid.

Eine Kette von bis zu 100 Aminosäuren wird als Peptid bezeichnet und mit mehr als 100 Aminosäuren als Protein. Proteine und Peptide fungieren im Organismus z. B. als Katalysatoren (Enzyme) und liegen entweder in der  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblatt-Struktur vor. Diese Strukturen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Ionenbindungen stabilisiert.<sup>[84, 85]</sup> In **Abbildung 12** sind die Strukturen der Dipeptide Serin-Tyrosin (Ser-Tyr) und Alanin-Tyrosin (Ala-Tyr) gezeigt.



**Abbildung 12:** Struktur der Dipeptide Ser-Tyr und Ala-Tyr.

### **3 Verwendete Methoden**

#### **3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Mit der Rasterelektronenmikroskopie können Oberflächen sehr kleiner Partikel sichtbar gemacht werden. Die maximale Auflösung dieser Methode liegt bei 5-10 nm. Die Energie des Elektronenstrahls liegt zwischen 12,5 und 30 kV. Nicht elektrisch leitende Proben wie z. B. Calciumphosphate müssen mit einer elektrisch leitenden Schicht bedampft werden.<sup>[2, 63, 95, 96]</sup>

Bei der Wechselwirkung von Elektronenstrahl und Probe entstehen im Rasterelektronenmikroskop Primär- und Sekundärelektronen. Zudem entstehen auch Röntgenstrahlen; sie können analytisch für die energiedispersive Röntgenspektroskopie genutzt werden.<sup>[2, 63, 96]</sup>

##### **3.1.1 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)**

Der energiedispersive Röntgendetektor wird oft in Verbindung mit einem Elektronenmikroskop genutzt. Bei der Elektronenmikroskopie entsteht durch die Bestrahlung der Probe Röntgenstrahlung, die für jedes Element eine charakteristische Wellenlänge besitzt. Diese Eigenschaft wird in der energiedispersiven Röntgenspektroskopie genutzt. Im EDX-Spektrum können so die entstandenen Peaks den Elementen der Probe zugeordnet und über die Intensität quantitativ analysiert werden.<sup>[2, 96]</sup>

Die festen Proben wurden mit einem Kohlenstofffilm auf dem Probenträger fixiert. Von den Dispersionen wurden 20 µL auf einen Si-Waver gegeben und eingetrocknet und mit einem Kohlenstofffilm auf dem Probenträger fixiert. Alle Proben wurden 0,5 min mit einer Au/Pd-Schicht bedampft. Die Proben wurden mit einem ESEM FEI Quanta 400 FEG vermessen.

Die EDX-Spektren wurden mit einem EDAX EDS-Analysensystem Genesis 4000 aufgenommen.



### **3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

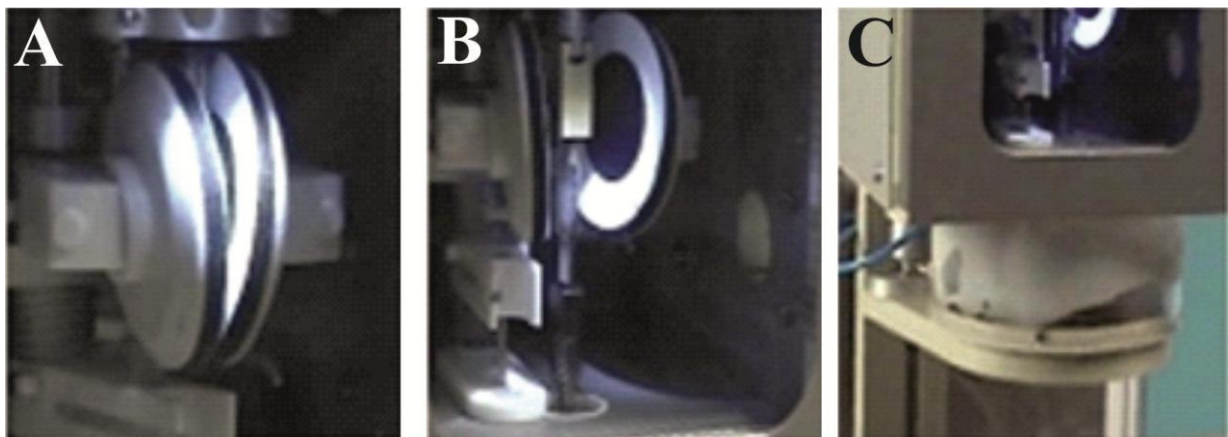
Die Transmissionselektronenmikroskopie funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie die Rasterelektronenmikroskopie. Die Beschleunigungsspannung liegt bei der TEM zwischen 50 und 300 kV und damit viel höher als beim REM. Trifft nun der Elektronenstrahl auf die Probe, so wird diese durchstrahlt und die Elektronen werden teilweise abgelenkt. Die Ablenkung resultiert aus der Elektronendichte der Probe. Durch die gestreuten Elektronen, welche durch ein Objektiv gesammelt werden, entsteht ein Zwischenbild. Dieses Zwischenbild wird zusätzlich auf einen Leuchtschirm projiziert.<sup>[96, 97]</sup>

Die Proben wurden an einem Philips CM 200 FEG sowie an einem FEI Tecnai 20 Type Sphera vermessen.

#### **3.2.1 Kryo-TEM**

Die Kryo-TEM ermöglicht das Abbilden von suspendierten Proben. Dazu wird das Probenmaterial durch das Eintauchen in flüssiges Ethan (-183 °C) schockgefroren. Die Flüssigkeitsfilme, in denen sich die Nanostrukturen befinden, haben für dieses Verfahren eine Dicke von ca. 100 nm. Der so entstandene elektronentransparente Film besteht aus glasartigem amorphen Eis. Mittels Kryo-TEM ist es so möglich, Proben in einem nativen hydratisierten Zustand abzubilden. Die zu untersuchende Probe bleibt bei schnellem Abkühlen mit flüssigem Ethan in ihrem Suspensionsmedium, dadurch bleibt auch die räumliche und zeitliche Anordnung der Nanopartikel erhalten. Nun kann die glasartige Probe bei tiefen Temperaturen untersucht werden. Die Temperatur muss tief genug sein, um eine Rekristallisation des amorphen Films zu vermeiden.<sup>[98]</sup>

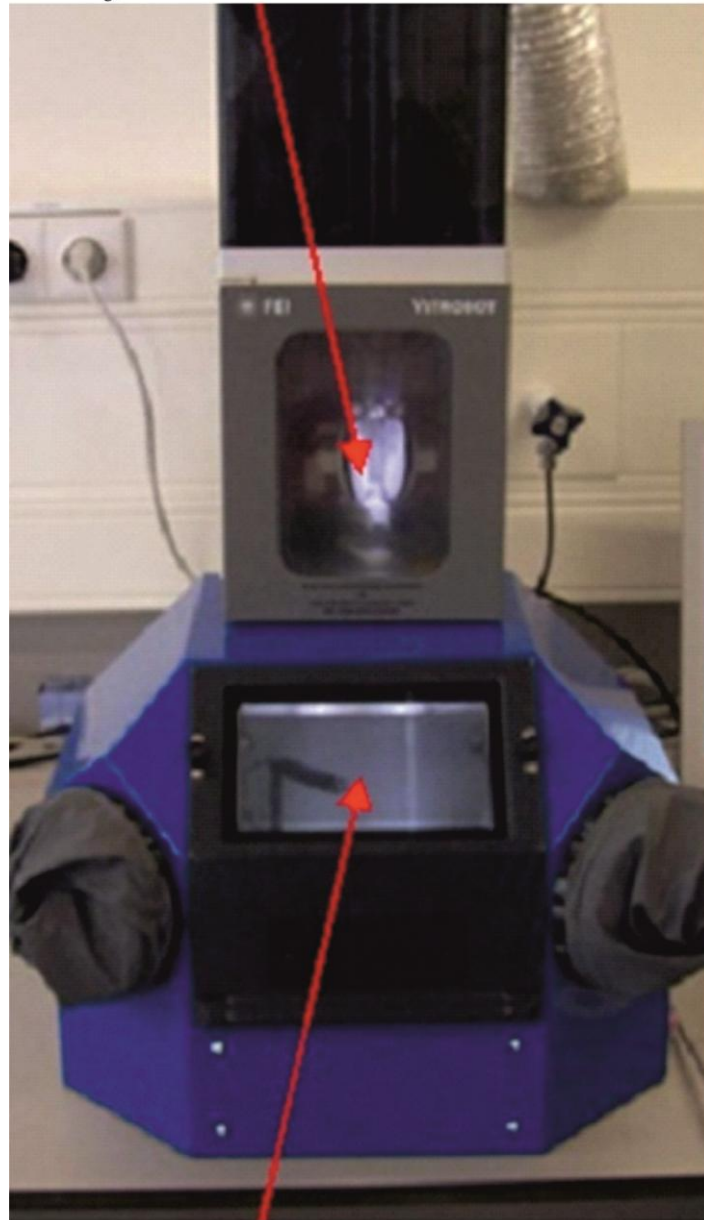
Um die Probe im Kryo-TEM nutzen zu können, bedarf es eines speziellen Probenvorbereitungsverfahrens. Dazu wird ein Mikroliter-Tropfen der Probe auf das Trägergitter gegeben und anschließend mit einem Filterpapier abgetupft (**Abbildung 13**). Durch das *Blotten* wird das Probenvolumen auf ca. 1/5000 des Ursprungs verringert, um einen 100 nm dünnen Probefilm zu erhalten. Da so ein großes Oberflächen/Volumenverhältnis entsteht, sind ein schneller Wärmeaustausch und gute Glasbildung gewährleistet. Nach dem Abtupfen der Probe wird sie schnell in flüssiges Ethan gegeben und eingefroren (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13:** Kryo-TEM Probenvorbereitung A) *Blotten* B) und C) schnelles Einfrieren.

**Abbildung 14** zeigt den gesamten Vitrobot. Es können auch zeitaufgelöste Reaktionen auf dem Probenträger durchgeführt werden.<sup>[98]</sup>

## *Vitrification* Roboter-Kammer



Glove-Box

**Abbildung 14:** Vitrobot zur Herstellung von Kryo-TEM-Proben.

Für die Probenvorbereitung wurde ein Vitrobot Mark III von FEI verwendet. Für die Abbildung der Proben wurden ein Tecnai 20 Type Sphera und ein Kryo-TITAN FEG von FEI verwendet.

### **3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotential**

Die Größe von dispergierten Nanopartikeln kann mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung bestimmt werden. Die Größenbestimmung des hydrodynamischen Radius erfolgt über die Brown'sche Molekularbewegung und kann durch die Stokes-Einstein-Beziehung berechnet werden. Die Stokes-Einstein-Beziehung lautet:

$$r = \frac{R \cdot T}{D \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot N_A} \quad (3)$$

mit:

$r$  = Partikelradius;  $D$  = Diffusionskoeffizient;  $R$  = allgemeine Gaskonstante;  $N_A$  = Avogadro-Konstante;  $\eta$  = Viskosität der kontinuierlichen Phase und  $T$  = Temperatur.

Das Zetapotential wird über die elektrophoretische Mobilität der Partikel bestimmt, da es nicht direkt am Partikel bestimmt werden kann. Die Messung der elektrophoretischen Mobilität erfolgt über das *Laser-Doppler-Velocimetry*-Verfahren. Berechnet wird das Zetapotential über die Henry-Gleichung:

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(\kappa\alpha)}{3 \cdot \eta} \quad (4)$$

mit:

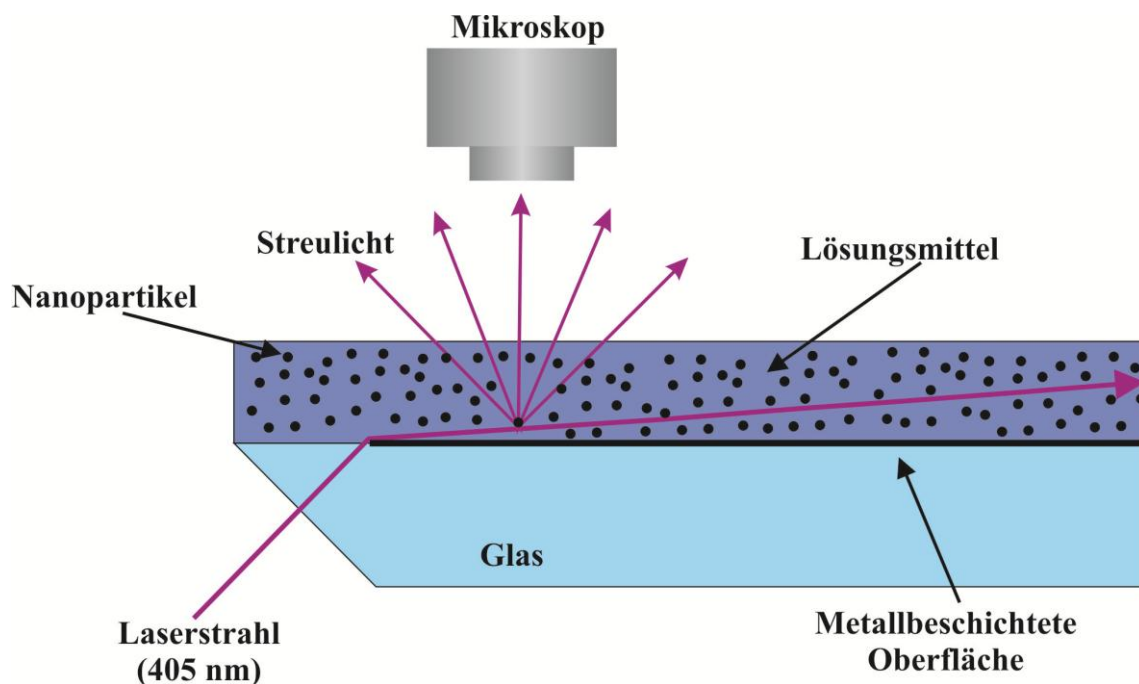
$U_E$  = elektrophoretische Mobilität;  $\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante der kontinuierlichen Phase;  $\zeta$  = Zetapotential  $f(\kappa\alpha)$  = Henry-Funktion und  $\eta$  = Viskosität der kontinuierlichen Phase. <sup>[42, 44, 99-101]</sup>

Gemessen wurde an einem Malvern Zetasizer NanoZS (633 nm Laser). Für die Titrationen wurde ein Malvern MPT-2-ZEN 1001 Autotitrator verwendet.

### **3.4 Nanoparticle-Tracking-Analysis (NTA)**

Die *Nanoparticle-Tracking-Analysis* ist eine Methode zur Größenbestimmung von Nanopartikeln. Der Arbeitsbereich der NTA liegt zwischen 10 nm und 2000 nm. Im Gegensatz zur DLS werden hier einzelne Nanopartikel sichtbar gemacht.

Die Visualisierung der Nanopartikel erfolgt analog zur DLS durch Einstrahlen von Laserlicht (405 nm). Im Gegensatz zur DLS werden bei der NTA die einzelnen Nanopartikel in Form von Reflexionspunkten analysiert. Diese Reflexionspunkte haben durch die Brown'sche Molekularbewegung eine Eigenbewegung, die von der Software ausgewertet wird. Die Detektion der Reflexionspunkte erfolgt über eine CCD-Kamera. Die Größe wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung (3) berechnet.<sup>[42, 102, 103]</sup> In **Abbildung 15** ist der Aufbau der NTA dargestellt.



**Abbildung 15:** Schematischer Aufbau der *Nanoparticle-Tracking-Analysis* (NTA).

Die NTA-Messungen wurden mit einem LM14-HS (Laser 405 nm) der Firma NanoSight durchgeführt.

### **3.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic force microscopy*, AFM) wird zur Abbildung der Oberflächenstruktur verwendet. Die Auflösung der AFM beträgt einige Nanometer. Mit der AFM wird die Kraftwechselwirkung einer feinen Messspitze und der Oberfläche der Probe gemessen. Die Messspitze aus Silicium befindet sich an einem *Cantilever* (Hebelarm), der über die Probe geführt wird. Die Messungen können auf zwei Arten durchgeführt werden, im Kontakt- sowie im Nonkontaktmodus bzw. *Tapping*-Modus. Beim Kontaktmodus steht die Messspitze im direkten Kontakt zur Probe, beim Nonkontaktmodus bzw. *Tapping*-Modus wird die Probe durch Schwingung des Cantilevers untersucht. Durch die Kraftwechselwirkung zwischen Probe und Spitze erfolgt eine Auslenkung des Cantilevers, die über die Reflexionsänderung eines Laserstrahls gemessen wird. Durch *Nanoindentation* können auch Eindrückversuche an hohlen Proben durchgeführt werden.<sup>[63, 104-106]</sup> Die Proben wurden an einem NanoWizard der Firma JPK und einem Veeco der Firma diInnova vermessen.

### **3.6 Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS)**

Mit der Massenspektroskopie (MS) wird das Verhältnis von Masse  $m$  zur Ladung  $z$  einer Probe bestimmt. Es können Massen von 5 bis 300.000 Da analysiert werden. Eine Hauptanwendung der MS ist die Strukturaufklärung organischer und metallorganischer Moleküle. Ein Massenspektrometer besteht aus dem Einlasssystem, der Ionisationseinheit, der Massentrenneinheit und einem Detektor. Als Ionisationsmethode wurde in dieser Arbeit die Elektrosprayionisation (ESI) verwendet, dabei wird von der flüssigen Probe mit Hilfe eines Trägergases ein Aerosol erzeugt. Durch Anlegen einer Spannung werden geladene Tröpfchen erzeugt. Durch Verdunsten des Lösungsmittels gelangen nur noch Ionen in das Massenspektrometer.<sup>[63, 107-109]</sup> Die Proben wurden an einem ESQUIRE 3000 der Firma BRUKER gemessen.

### **3.7 Infrarotspektroskopie (IR)**

Bei der Infrarotspektroskopie werden Molekül- und Rotationsschwingungen beobachtet. Diese Schwingungen werden durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung im Infrarotbereich hervorgerufen. Die IR-Spektroskopie gehört aus diesem Grund auch zur Schwingungsspektroskopie. Bei den konventionellen IR-Spektrometern werden die Spektren schrittweise aufgezeichnet. Bei den Fourier-Transform-IR-Spektrometern werden die gesamten Informationen zum Spektrum als Interferogramm dargestellt. Durch die IR-Spektroskopie können einzelne funktionelle Gruppen in einem Molekül bestimmt werden. Breite IR-Banden entstehen durch amorphe oder nanokristalline Proben.<sup>[2, 63, 108]</sup>

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurden KBr-Presslinge mit einem Bruker Vertex 70 vermessen.

### **3.8 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)**

Die Röntgenbeugung (XRD) wird durch Beugung und Interferenz von elektromagnetischen Wellen hervorgerufen. Die Röntgenstrahlung wird dabei unter bestimmten diskreten Winkeln am Kristallgitter der Probe reflektiert. Trifft die Röntgenstrahlung mit dem Einfallswinkel  $\Theta$  auf die Netzebenenschar  $hkl$ , so wird die Strahlung so gebeugt, dass der abgelenkte Strahl den gleichen Winkel zu der Netzebenenschar hat wie die Röntgenstrahlung.<sup>[2, 63, 95]</sup>

Konstruktive Interferenz kann nur auftreten, wenn die Braggsche Gleichung erfüllt ist. Die Braggsche Gleichung lautet:

$$n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\Theta \quad (5)$$

mit:

$n$  = Ordnung der Beugung;  $\lambda$  = Wellenlänge der Röntgenstrahlung;  $d_{hkl}$  = der Abstand der Netzebenenschar und  $\Theta$  = Beugungswinkel.<sup>[2, 95]</sup>

Mit der Scherrer-Gleichung kann die Kristallitgröße der Probe abgeschätzt werden.

Sie lautet:

$$D_{\text{hkl}} = (K \cdot \lambda) (\beta_{\text{hkl}} \cdot \cos \Theta)^{-1} \quad (6)$$

mit:

$D_{\text{hkl}}$  = angenäherte Kristallitgröße / Å;  $K$  = Faktor zwischen 0,8 und 1,2;  
 $\lambda$  = Wellenlänge der Röntgenstrahlung / Å ;  $\beta_{\text{hkl}}$  = Halbwertsbreite der Reflexe (hkl) im Radianten der  $2\Theta$ -Werte und  $\Theta$  = Beugungswinkel / °.<sup>[2]</sup>

Die Pulverdiffraktogramme wurden an einem Siemens D500 Pulverdiffraktometer mit einer Wellenlänge  $\lambda = 1,54060$  Å (Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung) aufgenommen. Die Proben wurden im Bereich von  $4-70^{\circ} 2\Theta$ , bei einer Schrittweite von  $0,02^{\circ} 2\Theta$  und einer Messzeit von 1 s bzw. 10 s aufgenommen.

Weitere Pulverdiffraktogramme wurden mit einem STADI P STOE Pulverdiffraktometer aufgenommen. Die Wellenlänge betrug ebenfalls  $\lambda = 1,54060$  Å. Die Kapillaren hatten einen Außendurchmesser von 0,5 mm und einen Innendurchmesser von 0,1 mm. Der Messbereich war  $4-70^{\circ} 2\Theta$ .

Als drittes Pulverdiffraktometer wurde ein Bruker D8 ADVANCE verwendet. Die Proben wurden in einem Messbereich von  $5-70^{\circ} 2\Theta$  aufgenommen. Die Wellenlänge war  $\lambda = 1,54060$  Å (Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung).



### **3.9 Thermogravimetrie (TG)**

Bei der Thermogravimetrie wird eine definierte Probenmasse erhitzt und der dabei auftretende Masseverlust ständig von der Thermowaage registriert; dadurch können verschiedene Zersetzungsvorgänge wie zum Beispiel die Abgabe von Hydratwasser untersucht werden. Mit der TG kann auch die Feuchtigkeit von Proben bestimmt werden. Durch die Wahl des Spülgases in der Thermowaage können Parameter wie Oxidation (O<sub>2</sub>) oder Zersetzung (Argon) bestimmt werden.<sup>[2, 63]</sup>

Für die Thermogravimetrie wurden ca. 30 mg Probe in einen Keramiktiegel eingewogen. Als Spülgas wurde Argon mit einer Flussrate von 50 mL min<sup>-1</sup> verwendet. Die Proben wurden mit einer Aufheizrate von 1 K min<sup>-1</sup> von 30 °C auf 1400 °C erhitzt. Für die Thermogravimetrie wurde eine Thermowaage STA 409 PC der Firma Netzsch verwendet.

### **3.10 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)**

Mit der AAS können Metalle quantitativ bestimmt werden. Für die Analyse muss die Probe mit der Flamme oder einem Graphitofen atomisiert werden. In der Flamme werden die Atome mit Licht im UV/Vis-Bereich angeregt. Das Anregungslicht stammt aus einer Hohlkathodenlampe, welche für jedes Metall spezifisch ist, und ein Detektor misst den Intensitätsunterschied. Einen quantitativen Vergleich liefert ein Intensitätsvergleich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz.<sup>[95]</sup>

Die Proben wurden mit dem Atomabsorptionsspektrometer M-Serie der Firma Thermo Electron vermessen.

### **3.11 UV-Spektroskopie (UV-VIS)**

Mit der Photometrie wird die Transmission bzw. die Extinktion beim Durchgang eines Lichtstrahls durch eine Küvette mit Probe gemessen. Für die quantitative Bestimmung ist das Herstellen einer Kalibrierkurve nötig. Durch eine Blindprobe werden gleichzeitig Messfehler wie Reflexion, Streulicht und Absorption der Küvette und des Lösungsmittels berücksichtigt.

Die Extinktion ist von der molaren Konzentration und der Schichtdicke der Küvette abhängig. Diese Abhängigkeit wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben.

Es lautet:

$$E = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (7)$$

mit:

$E$  = Extinktion;  $I$  = Intensität des transmittierten Lichtes;  $I_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes;  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient /  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $d$  = Schichtdicke / cm und  $c$  = Konzentration /  $\text{mol L}^{-1}$  [95]

Der Phosphatgehalt der Proben wurde mit einem Photometer Cary 300 der Firma Varian untersucht.

### **3.12 Größenausschlusschromatografie (SEC)**

Mit der Größenausschlusschromatografie (*size exclusion chromatography* SEC) werden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Die Probe wird dabei durch eine Säule mit einem porösen Material geleitet. Das poröse Material bildet die stationäre Phase der Chromatografie. Da kleine Moleküle besser an der stationären Phase absorbieren und in die Poren diffundieren können als große Moleküle, sind die großen Moleküle schneller. Diese haben daher eine kürzere

Retentionszeit als die kleinen Moleküle. Über die Retentionszeit erfolgt so eine Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe.<sup>[63, 107]</sup>

### **3.13 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)**

Grundlage der NMR-Spektroskopie sind die Präzessionsbewegung, der Drehimpuls (Spin) und das magnetische Moment  $\mu$  in einem äußeren Magnetfeld. Die Einstellung von Spin und magnetischem Moment ist nur in bestimmten Richtungen möglich, wobei die Anzahl der energetischen Einstellungsmöglichkeiten durch die Kernspin-Quantenzahl  $I$  festgelegt ist. Die Kernspin-Quantenzahl beträgt bei den meisten für die NMR-Spektroskopie interessanten Isotopen  $1/2$ ,  $3/2$ ,  $5/2$  oder  $7/2$ .<sup>[63, 86, 95, 108]</sup> Die in der NMR-Spektroskopie am häufigsten untersuchten Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  haben den Spin  $1/2$  und daher zwei Einstellungsmöglichkeiten. Die chemische Verschiebung lässt Rückschlüsse darüber zu, welche chemischen Gruppen oder Atome in welchem Bindungsverhältnis vorliegen. So absorbieren gleichartig gebundene Atome jeweils bei ungefähr gleicher chemischer Verschiebung.<sup>[63, 86, 95, 108]</sup>

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker dxp300 avance (300 MHz) gemessen.

### **3.14 Elementaranalyse (EA)**

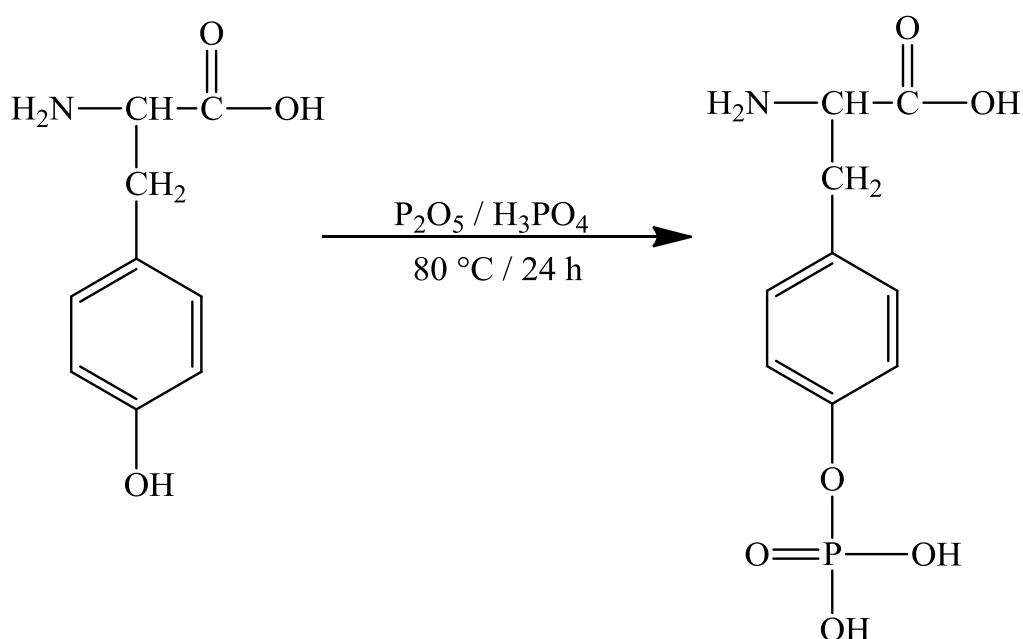
Mit der Elementaranalyse können Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel bestimmt werden. Bei der EA werden die Proben verbrannt und die entstehenden Gase chromatographisch getrennt. Die Verbrennung erfolgt bei 900 °C in einem O<sub>2</sub>-Strom. Die Quantifizierung der Gase erfolgt dann mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor.<sup>[95]</sup>

Die Elementaranalysen wurden mit einem EA 1110 Gerät der Firma CE-Instruments durchgeführt, sowie an einem EURO EA Elemental Analyzer EURO VECTOR.

## 4 Durchführung

### 4.1 Herstellung von *O*-Phospho-L-Tyrosin

Das *O*-Phospho-L-Tyrosin wurde nach der Synthese von ALEWOOD<sup>[110]</sup> hergestellt. Dazu wird L-Tyrosin mit einem Gemisch aus Phosphorpentoxid und Phosphorsäure umgesetzt und wie in der Literatur beschrieben aufgearbeitet.<sup>[110]</sup>



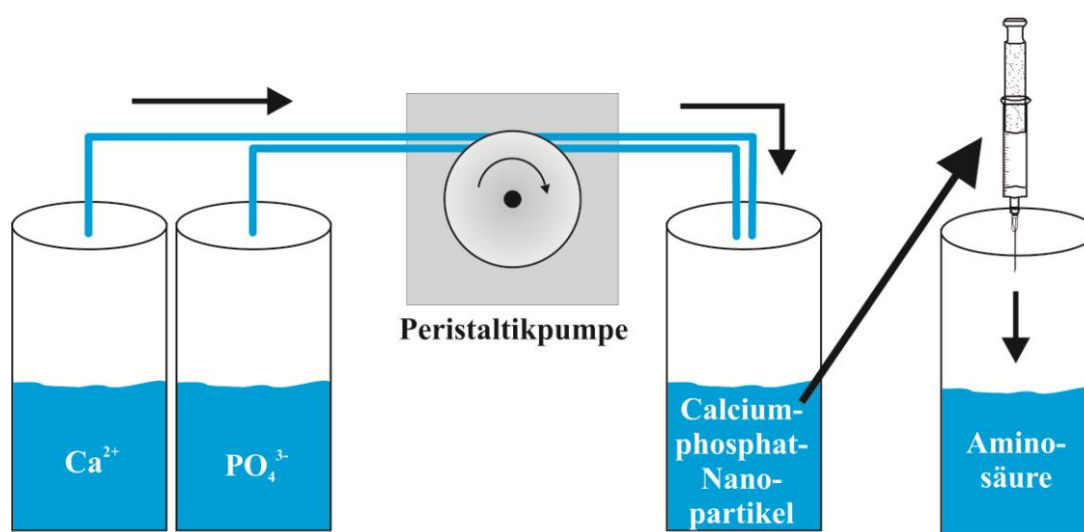
**Abbildung 16:** Reaktionsgleichung zur Herstellung von *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Für die Reaktion wurden 71,36 mmol Phosphorpentoxid in 0,12 mol Phosphorsäure gelöst. Anschließend wurden 17,77 mmol L-Tyrosin dem Phosphorsäure / Phosphorpentoxidgemisch beigelegt und für 24 h bei 80 °C gerührt.

Das erhaltene Produkt wurde gereinigt und mittels Elementaranalyse, IR und NMR charakterisiert.

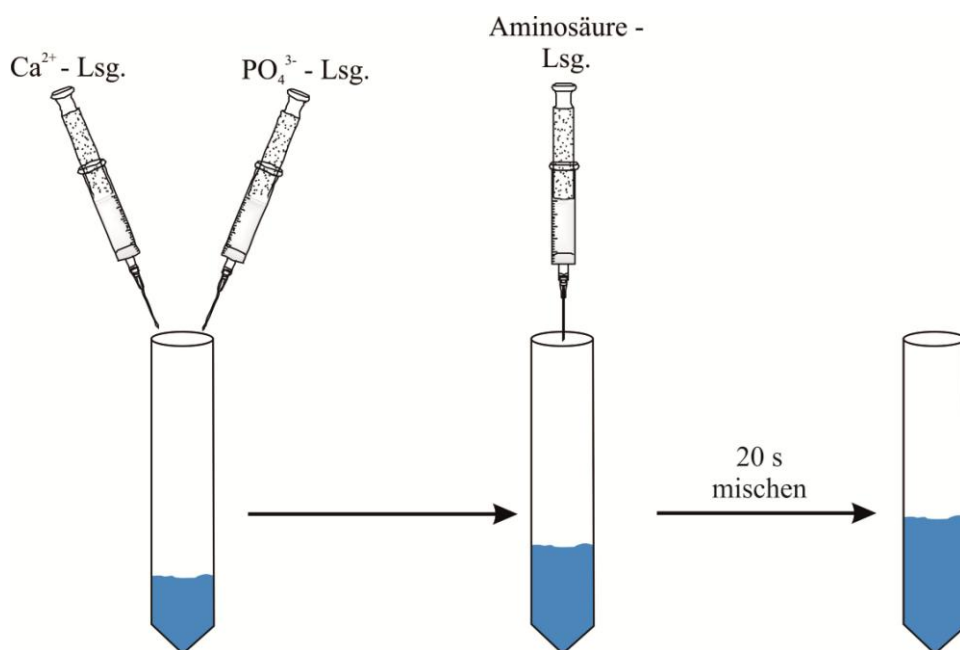
## **4.2 Herstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln**

Die Herstellung der primären Calciumphosphat-Nanopartikel erfolgte gemäß der Literatur<sup>[67]</sup> durch Zusammenpumpen einer wässrigen Lösung von  $3 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$  und einer wässrigen Lösung von  $1.8 \text{ mmol L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  in ein Reaktionsgefäß. Die pH-Werte der Lösungen wurden mit NaOH auf  $\text{pH} = 9$  eingestellt. In dem Reaktionsgefäß wurden die Lösungen durch Rühren gut vermischt. Das Ca/P-Verhältnis wurde so gewählt, dass es dem von Hydroxylapatit entspricht. Nach wenigen Sekunden des Rührens wurde die Calciumphosphatdispersion schnell in eine wässrige Aminosäure- oder Dipeptidlösung gegeben. Die Konzentration der Aminosäure- oder Dipeptidlösung lag bei  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  oder  $3 \text{ mmol L}^{-1}$ , der pH-Wert wurde ebenfalls mit NaOH auf  $\text{pH} = 9$  eingestellt. Das Volumenverhältnis der Calciumphosphat-Dispersion (CaP) zu der Aminosäure- oder Dipeptidlösung lag bei 1:1 mL oder bei 2:1 mL. Die Konzentrationen und Volumenverhältnisse wurden nach GANESAN<sup>[14]</sup> gewählt. Für alle Lösungen wurde Reinstwasser mit einem Widerstand von  $18 \text{ M}\Omega$  verwendet. In **Tabelle 6** sind alle Ansatzgrößen der Aminosäure- und Dipeptidlösungen dargestellt. **Abbildung 17** zeigt den schematischen Aufbau der Syntheseanlage.



**Abbildung 17:** Schematischer Aufbau der Syntheseanlage für Calciumphosphat-Hohlpartikel.

Als alternative Methode zur Darstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln wurden gleiche Mengen einer  $3 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung und einer  $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ -Lösung mit einer Eppendorfpipette zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde kurz geschüttelt, und anschließend wurde die Aminosäurelösung in die Calciumphosphatdispersion gegeben. Die Ansatzgrößen der Aminosäure sind in **Tabelle 6** angegeben. Der schematische Versuchsaufbau ist in **Abbildung 18** dargestellt.



**Abbildung 18:** Alternative Methode zur Herstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln.

**Tabelle 6:** Ansatzgrößen der Aminosäurelösung.

Aminosäure oder Dipeptid	Eingesetzte Aminosäure Konzentration / $\text{mmol L}^{-1}$	Volumenverhältnis CaP : AS	Endkonzentration Aminosäure / $\text{mmol L}^{-1}$
L-Alanin	3	1:1	1,5
L-Serin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05
O-Phospho-L-Serin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05
L-Tyrosin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05
O-Phospho-L-Tyrosin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05
Serin-Tyrosin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05
Alanin-Tyrosin	3 und 1,5	1:1 und 2:1	1,5; 1 und 0,75; 05

Im Folgenden bezieht sich die Angabe 1,5 mM (1:1) auf die eingesetzte Konzentration von 3 mM und einem Volumenverhältnis von 1:1. Diese Schreibweise gilt ebenso für die anderen verwendeten Konzentrationen und Volumenverhältnissen der Aminosäuren.

### **4.2.1 Temperaturstabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel**

Um die Temperaturstabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion zu überprüfen, wurden die Größe und das Zetapotential mittels eines Temperaturprogramms des Malvern Zetasizer Nano ZS gemessen. Dazu wurden die Proben von 20 °C auf 70 °C bzw. 80 °C in 5 K-Schritten erhitzt und anschließend wieder auf 20 °C abgekühlt. Die Verweilzeit bei 70 °C bzw. 80 °C lag bei ca. 5 min. Die Heizrate war 1,57 K min<sup>-1</sup> und die Kühlrate lag bei 1,67 K min<sup>-1</sup>. Eine weitere Methode zur Überprüfung der Temperaturstabilität bestand darin, die Probelösung für eine Stunde bei 70 °C im Trockenschrank zu lagern. Anschließend wurden die Proben mittels REM untersucht.

### **4.2.2 pH-Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel**

Zur Überprüfung der pH-Stabilität wurde die Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion mittels des an den Zetasizer Nano ZS angeschlossenen Autotitrators MPT-2 titriert. Der pH-Wert wurde von pH = 8 auf pH = 3 mit HCl gesenkt, die Schrittweite lag bei 0,5 pH-Einheiten. Die pH-Senkungsrate lag bei 0,07 pH-Einheiten min<sup>-1</sup>. Bei jedem Schritt wurden die Größe und das Zetapotential bestimmt.

### **4.2.3 Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel gegen Ultraschall**

Die Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion gegen Ultraschall wurde mit Hilfe eines Sonorex-Ultraschallbades der Firma Bandelin durchgeführt. Es wurden Proben aus der Lösung nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 60 min entnommen. Von diesen Proben wurden die Größe und das Zetapotential bestimmt, des Weiteren wurde von jeder Probe ein REM-Bild aufgenommen.

#### **4.2.4 Analyse der Calciumphosphat-Hohlpartikel mittels UV/Vis-Spektroskopie**

Da die *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung ein Absorptionsmaximum bei 265 nm besitzt, kann eine Analyse mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt werden. Bei der Absorptionsbande handelt es sich um einen  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang im Aromaten von *O*-Phospho-L-Tyrosin.<sup>[108, 110]</sup>

Zur Anfertigung einer Kalibriergeraden wurden UV/Vis-Spektren von *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösungen mit den Konzentrationen 3,0; 2,33; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,375 und 0,25 mmol L<sup>-1</sup> aufgenommen.

Zur Bestimmung, wie viel Aminosäure in den Calciumphosphat-Hohlpartikeln enthalten ist, wurden diese durch Zentrifugation bei 2000 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Aminosäurekonzentration im Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.

Zur Überprüfung der Zentrifugation wurde die Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion mit einem 20 nm Anotopfilter filtriert. Die Aminosäurekonzentration im Filtrat wurde ebenfalls mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.

Um Adsorptionseffekte von Aminosäuren an Calciumphosphat auszuschließen, wurden 4 mL einer 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mit 1,7 g Hydroxylapatit versetzt und sehr gut vermischt. Die Lösung wurde zentrifugiert und die Aminosäurekonzentration im Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.



### **4.3 Aminosäuren in wässrigen Lösungen**

Zur Analyse und zum Nachweis der supramolekularen Selbstorganisation von Aminosäuren in wässrigen Lösungen wurden Lösungen der Aminosäuren Glycin, L-Alanin, L-Serin, *O*-Phospho-L-Serin, L-Tyrosin, und *O*-Phospho-L-Tyrosin mit einer Konzentration von  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  hergestellt. Der pH-Wert der Aminosäurelösungen wurde mittels NaOH so lange erhöht, bis erste Partikel in der NTA zu sehen waren. Von diesem Punkt an wurde der pH-Wert weiter bis auf  $\text{pH} = 9$  erhöht.

Zur Überprüfung, ob die supramolekulare Selbstorganisation von Aminosäuren in wässrigen Lösungen von der Base abhängt, wurde der pH-Wert bei der Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin mittels Ammoniak-Lösung eingestellt. Um die Vesikelbildung besser erklären zu können, wurden auch  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  Lösungen von Harnstoff, Natriumacetat und *para*-Aminosalicylsäure verwendet. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde auf  $\text{pH} = 9$  eingestellt.

#### **4.3.1 Temperaturstabilität der Aminosäurevesikel**

Um den Temperatureinfluss und die Temperaturstabilität auf die Aminosäurevesikel zu testen, wurde eine  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Mittels der NTA wurde ein Temperaturbereich zwischen  $20^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$  untersucht. Die Schrittweite zwischen den einzelnen Messungen lag bei 5 K.

#### **4.3.2 pH-Stabilität der Aminosäurevesikel**

Zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses auf die Bildung der Aminosäurevesikel wurde eine  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mit Natriumhydroxid titriert. Die Titration wurde mit einem Autotitrator durchgeführt, gleichzeitig wurden die elektrische Leitfähigkeit und das Zetapotential bestimmt. Die pH-Messung wurde von einem pH-Wert von 2,2 bis 9,85 durchgeführt.

Des Weiteren wurde die 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung bei verschiedenen pH-Werten mittels NTA analysiert.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit der Bildung von Aminosäurevesikeln war die Aufnahme von <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei verschiedenen pH-Werten. Für diese Bestimmung wurde *O*-Phospho-L-Tyrosin in NMR-Röhrchen im D<sub>2</sub>O gelöst. Durch die Zugabe von NaOD gelöst in D<sub>2</sub>O wurde der pH-Wert eingestellt. Es wurden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei den pH-Werten 1,84; 2,01; 3,50; 4,75; 5,44; 6,46; 7,56; 8,55; 9,50; 10,49; 11,57; 12,47 und 13,03 aufgenommen.

#### **4.3.3 Verschiedene Trocknungsmethoden für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Aminosäuren**

Um zu versuchen, die Aminosäurevesikel mittels Rasterelektronenmikroskopie abzubilden, wurden verschiedene Trocknungsmethoden verwendet. Hierzu wurden 20 µL einer 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mit einem pH-Wert von 9 auf einen Siliciumwafer gegeben und bei Raumtemperatur sowie bei 70 °C eingetrocknet.

Als eine weitere Trocknungsmethode wurde die Gefriertrocknung verwendet, dazu wurden ebenfalls 20 µL der Aminosäure- und Dipeptidlösungen mit einem pH-Wert von 9 auf einen Siliciumwafer getropft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet.

#### **4.3.4 Analyse der Aminosäurevesikel mittels Größenausschlusschromatografie**

Für die Analyse der 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mittels Größenausschlusschromatografie wurde diese auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Zum Einstellen des pH-Wertes wurde Ammoniak-Lösung verwendet.

#### **4.3.5 Massenspektroskopie von *O*-Phospho-L-Tyrosin**

Um die Aminosäurevesikel von *O*-Phospho-L-Tyrosin mit der Massenspektroskopie zu detektieren, wurde eine 3 mmol L<sup>-1</sup> Aminosäurelösung verwendet. Die massenspektroskopische Analyse fand bei den pH-Werten 2,5; 7,1 und 8,8 statt. Der pH-Wert wurde mittels Ammoniaklösung eingestellt. Alle Proben wurden anschließend im Volumenverhältnis 1:1 mit Methanol zur besseren Detektion vermischt.

#### **4.3.6 Rasterkraftmikroskopie und Probenpräparation durch *Spin Coating***

Für die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der Aminosäurevesikel wurden eine 3 mmol L<sup>-1</sup> und eine 1,5 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mittels Rotationsbeschichtung (*Spin Coating*) eingetrocknet. Dazu wurden 5 µL der Aminosäurelösung auf einen Glimmer(Mica)-Probenträger gegeben und dieser mit einer Umdrehungszahl von 107 U s<sup>-1</sup> rotationsbeschichtet. Die pH-Werte der Aminosäurelösung lagen bei pH = 2, pH = 9, eingestellt mit NH<sub>3</sub>, und pH = 11,5, eingestellt mit LiOH, des Weiteren wurde eine Aminosäurelösung mit einem pH-Wert von 2 mit NaCl versetzt. Anschließend wurden die Proben mittels AFM vermessen.

#### **4.3.7 Abschätzung der Aminosäuremenge in den Vesikeln**

Um abzuschätzen, wie viele Aminosäuremoleküle in einem Aminosäurevesikel erhalten sind, wurde das Volumen des *O*-Phospho-L-Tyrosin-Moleküls näherungsweise berechnet. Dazu wurde das Molekül mit dem Simulationsprogramm „Spartan“ dreidimensional dargestellt. Die Darstellung fand unter Verwendung des MMFF 94-Kraftfeldes statt. Für eine grobe Abschätzung des Volumens von *O*-Phospho-L-Tyrosin wurde eine quaderförmige Struktur angenommen.

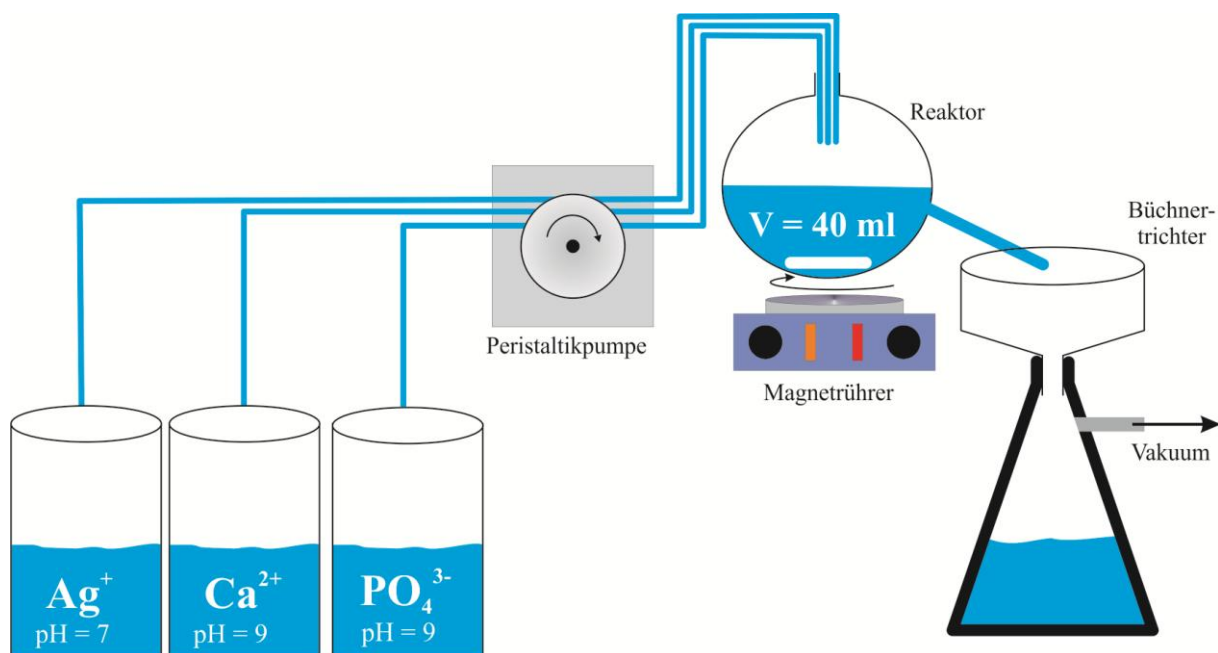
#### **4.4 Herstellung von Silber-dotiertem Hydroxylapatit**

Die Herstellung der Silber-dotierten HAP-Proben erfolgte nach einem etablierten kontinuierlichen Syntheseprozess in Anlehnung an die Literatur.<sup>[67, 69]</sup> Es wurden jedoch einige Änderungen bei der Herstellung vorgenommen.

Für die Herstellung des Silber-dotierten Hydroxylapatits wurden eine Calcium-nitratlösung mit einer Konzentration von  $16,2 \text{ mmol L}^{-1}$  bis  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  und eine Diammoniumhydrogenphosphatlösung mit einer Konzentration von  $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$  hergestellt; zudem wurden  $0 \text{ mmol L}^{-1}$  bis  $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$  Silber-nitratlösungen hergestellt. Aus diesen Ansatzgrößen resultierte ein Silbergehalt von 0 mol% bis 10 mol% bezogen auf das Calcium. Die Calcium- und die Phosphatlösung wurden mit einer wässrigen Ammoniaklösung auf pH 9 eingestellt. Der pH-Wert der Silberlösung blieb unverändert bei pH = 7. Das Calcium+Silber zu Phosphat Verhältnis lag bei allen Ansätzen bei  $\text{Ca} + \text{Ag}/\text{P} = 1,67$ . In **Tabelle 7** sind alle Ansatzgrößen für Silber und Calcium dargestellt. Die in **Abbildung 19** schematisch dargestellte Syntheseanlage wurde für die Herstellung von Hydroxylapatit verwendet.

**Tabelle 7:** Ansatzgrößen für die Herstellung von silberdotiertem HAP.

<b>Silberanteil</b> <b>/ mol%</b>	<b>Eingewogene Menge</b> <b>AgNO<sub>3</sub></b> <b>/ mg L<sup>-1</sup> und mmolL<sup>-1</sup></b>	<b>Calciumanteil</b> <b>/ mol%</b>	<b>Eingewogene Menge</b> <b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b> <b>/ mg L<sup>-1</sup> und mmol L<sup>-1</sup></b>
0	0,0000 ; 0,00	100	4,2507 ; 18,00
1	0,0306 ; 0,18	99	4,2082 ; 17,82
2	0,0612 ; 0,36	98	4,1657 ; 17,64
3	0,0917 ; 0,54	97	4,1232 ; 17,46
4	0,1223 ; 0,72	96	4,0807 ; 17,28
5	0,1529 ; 0,90	95	4,0382 ; 17,10
6	0,1836 ; 1,08	94	3,9957 ; 16,92
7	0,2142 ; 1,26	93	3,9532 ; 16,74
8	0,2448 ; 1,44	92	3,9107 ; 16,56
9	0,2754 ; 1,62	91	3,8682 ; 16,38
10	0,3058 ; 1,80	90	3,8256 ; 16,20



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Silberapatit-Fällungsanlage.

Der Volumenstrom der Reaktionslösungen für die Synthesen wurde mit der Peristaltikpumpe auf  $50 \text{ mL min}^{-1}$  je Lösung eingestellt. Dadurch ergibt sich nach Gleichung (1) eine Verweilzeit von 48 s.

Der entstehende Hydroxylapatit wird kontinuierlich über einen Büchnertrichter mit Blaubandfilter abfiltriert.

Am Ende der Reaktion wird der Hydroxylapatit mit Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei  $70^\circ\text{C}$  getrocknet.

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde auch reiner Silberphosphat ( $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ) hergestellt. Dazu wurden  $5,0964 \text{ g}$  ( $30 \text{ mmol L}^{-1}$ )  $\text{AgNO}_3$  und  $1,3206 \text{ g}$  ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ )  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  verwendet.

#### 4.4.1 Hochtemperaturphasen von Silber-dotiertem HAP

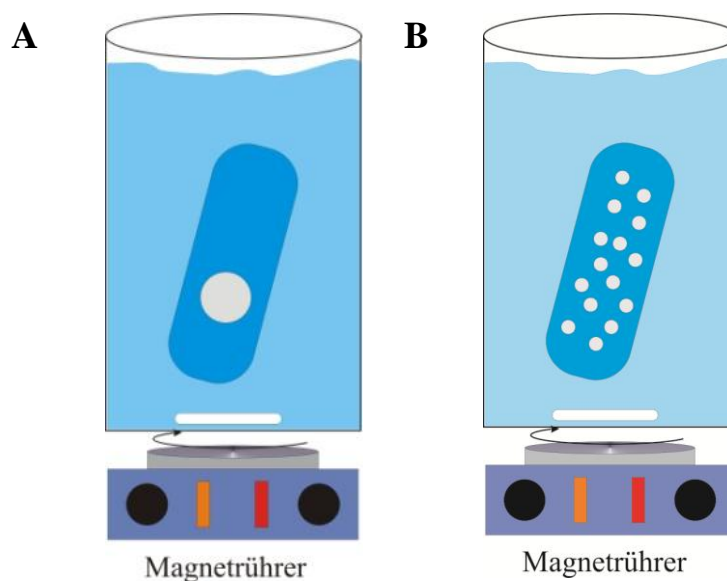
Zur Herstellung der Hochtemperaturphasen von Silber-dotiertem HAP wurden die Proben in Form von Presslingen und Pulver in dem Hochtemperaturofen FHT 175 der Firma Ceram-Aix auf  $850^\circ\text{C}$  für die  $\beta$ -TCP-Phase und auf  $1300^\circ\text{C}$  für die  $\alpha$ -TCP-Phase erhitzt. Die Temperzeit lag bei 24 Stunden.

#### 4.4.2 Silberfreisetzung aus Silber-dotiertem HAP

Für die Freisetzungsversuche von Silberionen aus Silber-dotiertem HAP,  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP wurden Presslinge aus den Silber-dotierten Calciumphosphaten, sowie Pulver der Silber-dotierten Calciumphosphate verwendet. Für die Freisetzungsversuche mit dem Pulver wurden 200 mg Silber-dotierter Calciumphosphat in einen mit 5 mL Wasser gefüllten Dialyseschlauch gegeben. Für die Freisetzungsversuche aus den Presslingen wurden 200 mg der Silber-dotierten Calciumphosphate 15 min bei 10 t gepresst. Der Durchmesser der Presslinge betrug 11 mm. Die Presslinge wurden ebenso wie das Pulver in einen mit 5 mL Wasser gefüllten Dialyseschlauch gegeben.

Für die Silberfreisetzung wurde zudem jeweils eine Blindprobe unter den gleichen Bedingungen mit reinem HAP und  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  durchgeführt.

Das Außenvolumen der Dialyse lag bei 500 mL. Die Permeabilität des Dialyseschlauchs lag bei 100.000 Da. Für die Silberbestimmungen wurden in einem Zeitraum von 2 h bis 152 Tagen bzw. 11 Tagen je 10 mL Probe entnommen und mittels AAS auf Silber hin analysiert. In **Abbildung 20** ist schematisch der Versuchsaufbau der Silberfreisetzung dargestellt.



**Abbildung 20:** Versuchsaufbau der Silberfreisetzung, A) für Presslinge und B) für Pulver.

## **4.5 Verwendete Chemikalien**

Für alle wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser oder bidestilliertes Wasser verwendet. In **Tabelle 8** sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 8:** Verwendete Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reinheit</b>
1-Butanol	Acros	$\geq 99 \%$
Ala-Tyr	Sigma	k.a.
Ammoniaklösung	Roth	$\geq 33 \%$
Boc-Ala-OH	Aldrich	$\geq 99 \%$
Calciumnitrat-Tetrahydrat	AppliChem	$\geq 98 \%$
	Merck	$\geq 98 \%$
Deuteriumoxid	Aldrich	$\geq 99,9 \%$
Spectra/Pro Biotech Cellulose Ester	Spectrum	k.a.
Dialyseschlauch 100-500 Da	Laboratories	
Spectra/Pro Biotech Cellulose Ester	Spectrum	k.a.
Dialyseschlauch 100.000 Da	Laboratories	
di-Ammoniumhydrogenphosphat	AppliChem	$\geq 98 \%$
	Baker	$\geq 98 \%$
Diethylether	Fischer Scientific	$\geq 99,82 \%$
Ethanol	VWR	$\geq 99,8 \%$
Glycin	Biomol	$\geq 99 \%$
Harnstoff	Merck	$\geq 99 \%$
HCl-Lösung $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
HCl-Lösung $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
HCl-Lösung $1 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
Hydroxylapatit	Merck	k.a.
L-Alanin	Sigma	$\geq 98 \%$

### *Durchführung*

Lithiumhydroxid	Merck	$\geq 98 \%$
L-Serin	Sigma	$\geq 99 \%$
L-Tyrosin	Fluka	$\geq 99 \%$
Methanol	J. T. Baker	$\geq 99 \%$
NaOH-Lösung $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
NaOH-Lösung $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
NaOH-Lösung $1 \text{ mol L}^{-1}$	AppliChem	$\geq 99,8 \%$
Natriumacetat	Riedel de Haen	$98,5 \%$
Natriumchlorid	Roth	$\geq 99 \%$
Natriumdeuteroxid	Acros	$\geq 98 \%$
Natriumhydroxid	Acros	$\geq 98 \%$
<i>O</i> -Phospho-L-Serin	Sigma	k.a.
<i>para</i> -Aminosalicylsäure	Acros	$\geq 99 \%$
Phosphorpentoxid	Acros	$\geq 98 \%$
Phosphorsäure	AppliChem	$\geq 85 \%$
Ser-Tyr	Sigma	k.a.
Silbernitrat	Roth	$\geq 99,9 \%$



## **4.5 Verwendete Geräte**

Folgende in **Tabelle 9** aufgeführte Geräte sind zur Anwendung gekommen.

**Tabelle 9:** Verwendete Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
AAS	M-Serie Thermo Electron
AFM	NanoWizard JPK Veeco diInnova
Anotopfilter	Inorganic Membrane Filter 0,02 µm Whatman
Bidest-Anlage	Destamat Bi 18 E Heraeus
DLS, Zetapotential	Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 mit Autotitrator MPT-2 Malvern
EA	EA 1110 CE-Instruments EURO EA Elemental Analyzer EURO VECTOR
EDX	EDS-Analysensystem Genesis 4000 EDAX
ESI-MS	ESQUIRE 3000 BRUKER
Gefriertrockner	Alpha 2-4 LSC Christ
Größenausschluss-Chromatographie- Säule	MZ HEMA Bio linear 10 µm 1 600/8mm HEMA
Hochtemperaturofen	FHT 175 Ceram-Aix
IR	Vertex 70 Bruker
Kryo-TEM Probenroboter	Vitrobot Mark III FEI
NMR	DPX 300 Bruker
NTA	LM14-HS NanoSight Laser 405 nm
pH-Meter	pH-430i WTW

---

---

### *Durchführung*

---

Reinstwasseranlage	Purelab ultra Instrument ELGA
REM	ESEM FEI Quanta 400 FEG
Spincoater SCV 15	Novocontrol
TEM	CM 200 FEG Philips
	Technai 20 type Sphera FEI
	Kryo-TITAN FEG
TG	STA 409 PC
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin
UV/Vis-Spektrometer	UV Cary 300 Varian
Waage	LA 310 Satorius
XRD	D500 Siemens
	STADI P STOE
	D8 ADVANCE Bruker
Zentrifuge	Sorvall WX Ultra Thermo
	Labofuge 300 Hereaus

---

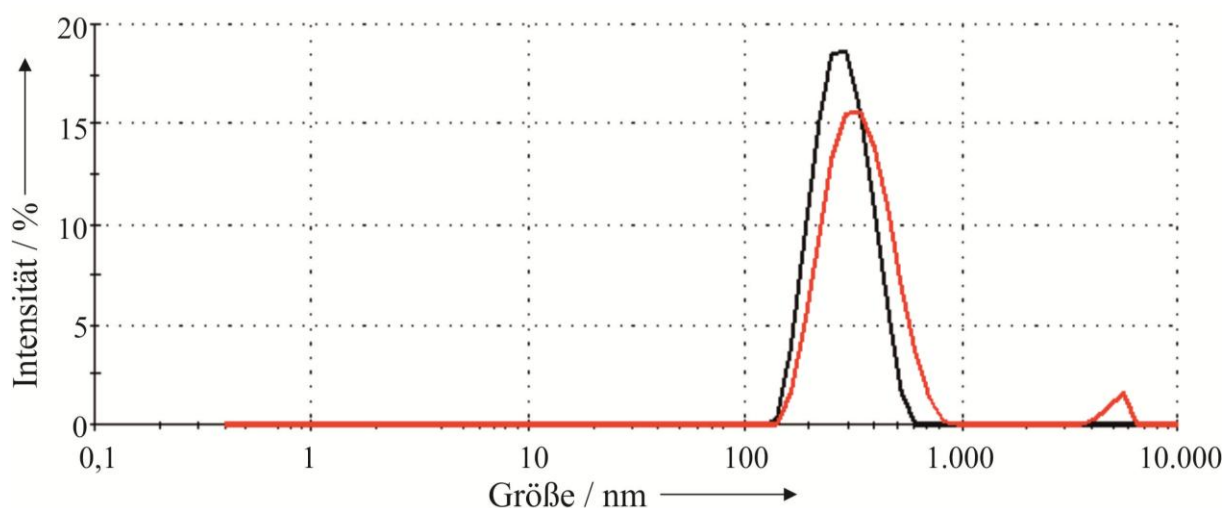
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Calciumphosphat-Hohlpartikel

Es wurden Calciumphosphat-Hohlpartikel mit den Aminosäuren *O*-Phospho-L-Tyrosin, L-Tyrosin, *O*-Phospho-L-Serin, L-Serin und L-Alanin hergestellt; des Weiteren wurden auch die Dipeptide Serin-Tyrosin und Alanin-Tyrosin verwendet. Alle Hohlpartikel-Dispersionen wurden umfangreich mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Im Nachfolgenden werden die einzelnen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

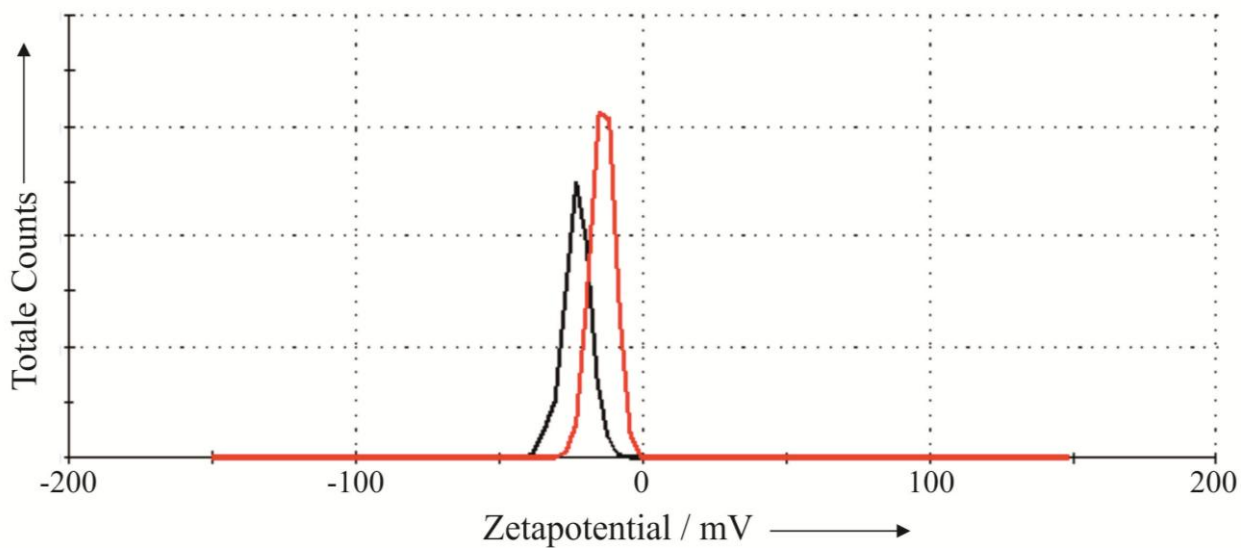
#### **5.1.1 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von *O*-Phospho-L-Tyrosin (TyrP)**

Die Calciumphosphat-Hohlpartikel wurden wie in Kapitel 4.2 beschrieben in Gegenwart von *O*-Phospho-L-Tyrosin (TyrP) hergestellt; die Konzentration von TyrP war 1,5 mM (1:1) und 0,5 mM (2:1). In **Abbildung 21** ist die Größenverteilung der entstandenen Partikel, bestimmt mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS), gezeigt.



**Abbildung 21:** Größenverteilung gemessen mittels DLS von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

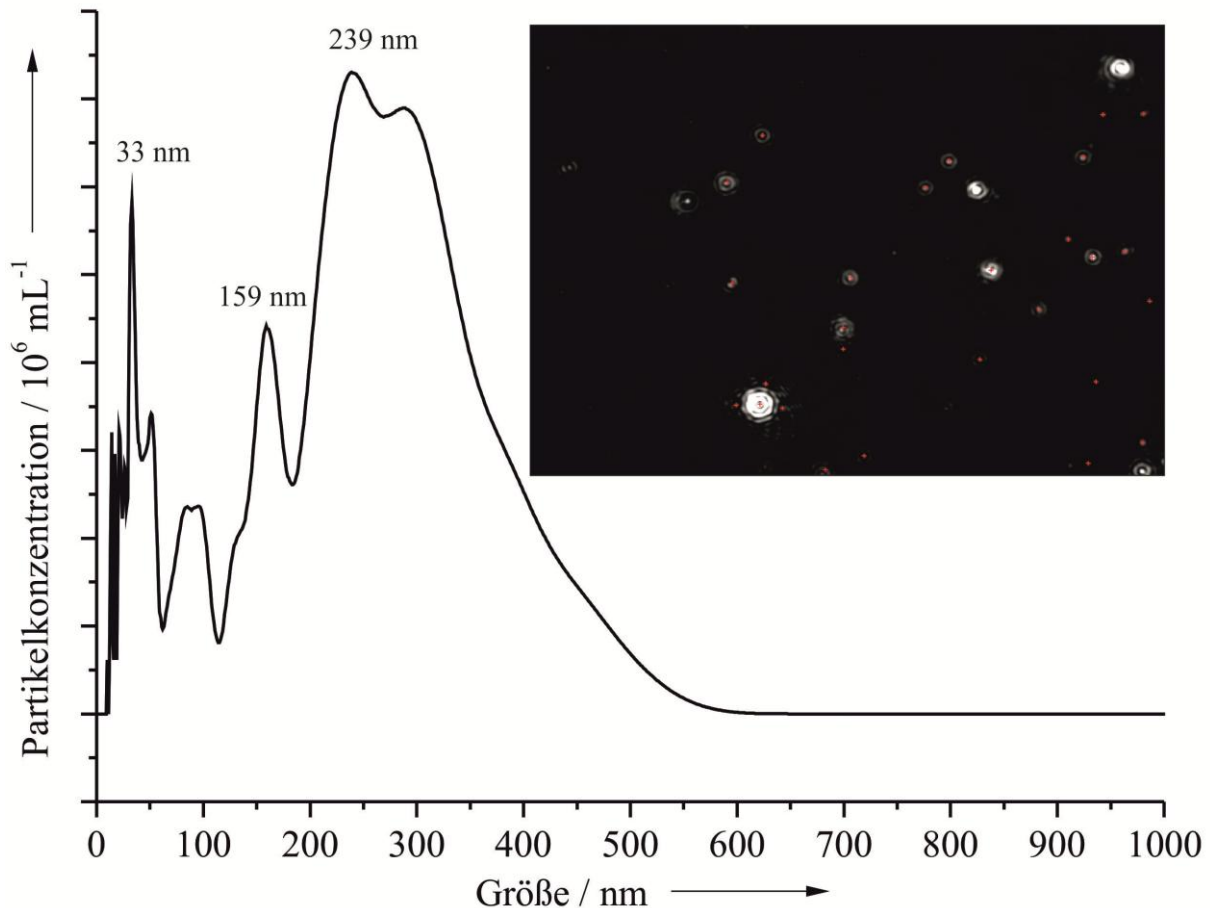
Der hydrodynamische Durchmesser der Hohlpartikel beträgt für den Ansatz mit 1,5 mM (1:1) TyrP 267 nm und für den Ansatz mit 0,5 mM (2:1) TyrP 343 nm. Neben dem Durchmesser der Partikel wurde auch das Zetapotential bestimmt. Wie in **Abbildung 22** gezeigt, beträgt das Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) TyrP, -23 mV. Für die in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) hergestellten Hohlpartikel, ergibt sich ein Zetapotential von -14 mV.



**Abbildung 22:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Die Zetapotentiale von -23 mV bzw. -14 mV zeigen, dass die hergestellten Hohlpartikel eine gewisse Zeit in Dispersion stabil sein sollten. Das Zetapotential ist ein Maß für die Oberflächenladung von Nanopartikeln und somit auch ein Maß für die elektrostatische Stabilisierung der Nanopartikel.<sup>[42]</sup>

Um die mittels DLS bestimmten Daten zu überprüfen und zu bestätigen, wurde von einer Hohlpartikel-Dispersion, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, eine *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) durchgeführt. Das Ergebnis der NTA sowie das dabei beobachtete Streulichtbild sind in **Abbildung 23** gezeigt.

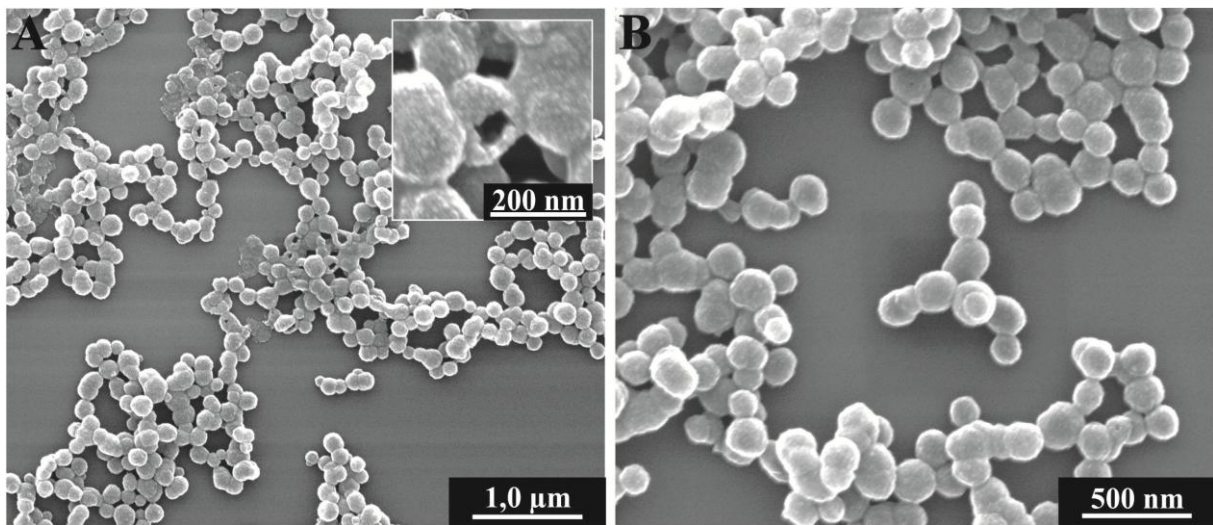


**Abbildung 23:** NTA-Messung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Mit der NTA wurde eine Größe der Partikel von 239 nm gemessen. Dieser Wert stimmte mit dem in der DLS beobachteten Wert überein. Mit der NTA wurden jedoch auch, wie in **Abbildung 23** zu sehen ist, Hohlpartikel mit kleineren Durchmessern von 159 nm und 33 nm beobachtet. Die Partikel mit einer Größe von 33 nm und kleiner könnten auf die primären Calciumphosphat-Nanopartikel zurückgeführt werden. Dass diese Partikelgrößen mit der DLS nicht beobachtet wurden, liegt am Messprinzip der Dynamischen Lichtstreuung.

Neben den kolloidchemischen Messmethoden wurden die Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von *O*-Phospho-L-Tyrosin, auch mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

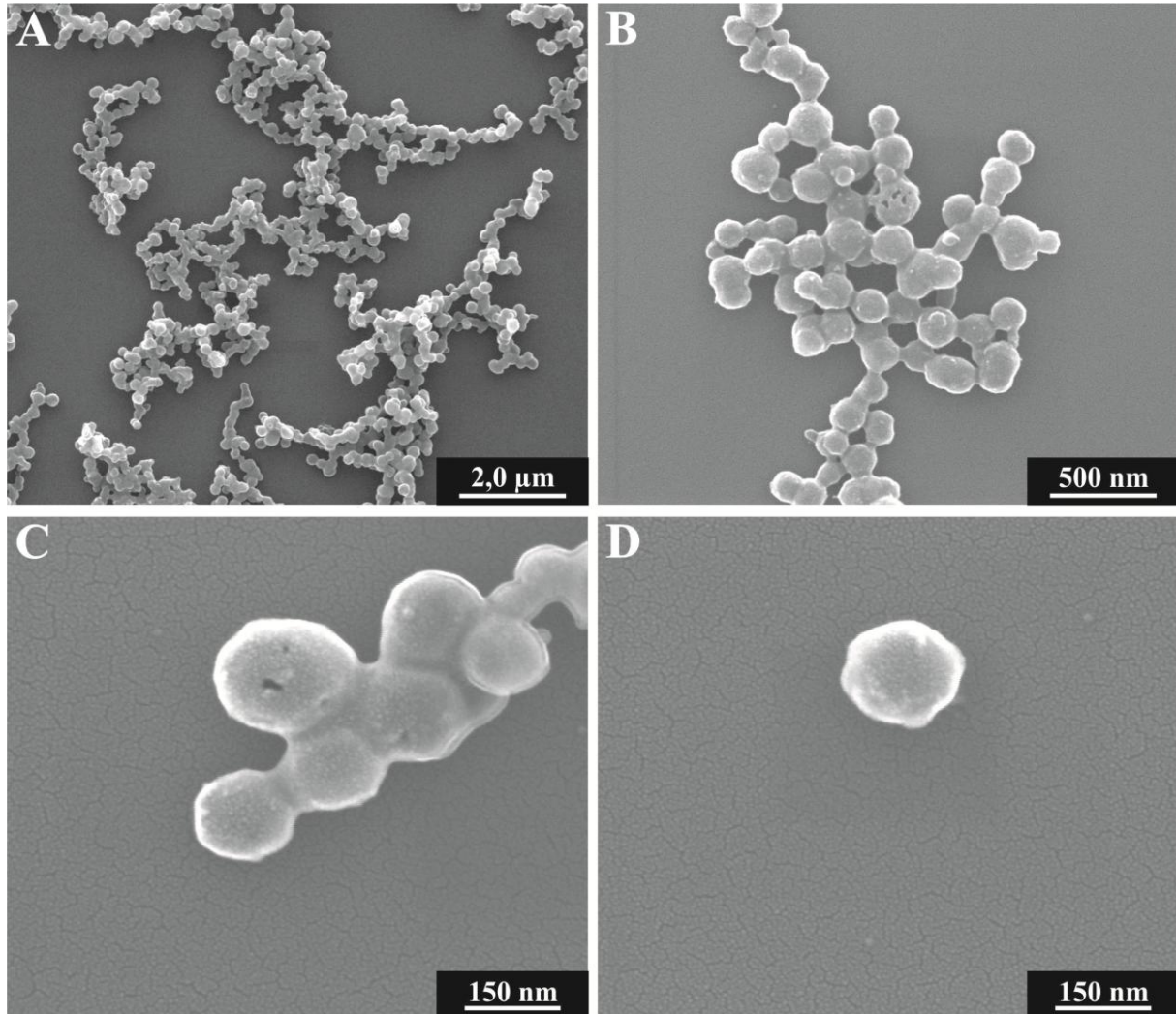
In **Abbildung 24 A** sind Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) TyrP, zu sehen. Die Partikel liegen monodispers vor, und einige Partikel sind durch das Trocknen aufgebrochen. In der Vergrößerung in **Abbildung 24 A** ist ein aufgebrochenes Partikel dargestellt. In dieser hohen Vergrößerung ist auch zu sehen, dass die Hohlpartikel aus vielen kleinen primären Calciumphosphat-Nanopartikeln bestehen. In **Abbildung 24 B** sind nur intakte Hohlpartikel zu sehen. Ihre Größe liegt zwischen 200 nm und 250 nm, was mit den Daten der NTA und der DLS übereinstimmt.



**Abbildung 24:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin. A) zeigt einige aufgebrochene Partikel mit einer Vergrößerung eines aufgebrochenen Partikels, B) zeigt nur intakte Partikel.

Wie von den mit 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin hergestellten Hohlpartikeln, wurden auch von den mit 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin hergestellten Hohlpartikel REM-Bilder angefertigt. Diese Bilder sind in **Abbildung 25** gezeigt. In **Abbildung 25 A** ist ebenfalls sehr gut sichtbar, dass auch diese Hohlpartikel monodispers vorliegen. In **Abbildung 25 B** und **C** sind aufgebrochene Partikel dargestellt. Wie bei den Hohlpartikeln, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) TyrP, bestehen auch diese Hohlpartikel aus kleinen 10-30 nm großen Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Größe der Partikel liegt auch hier

zwischen 200 nm bis 250 nm und stimmt mit den Ergebnissen aus der Dynamischen Lichtstreuung überein. **Abbildung 25 D** zeigt eine Vergrößerung eines Hohlpartikels.



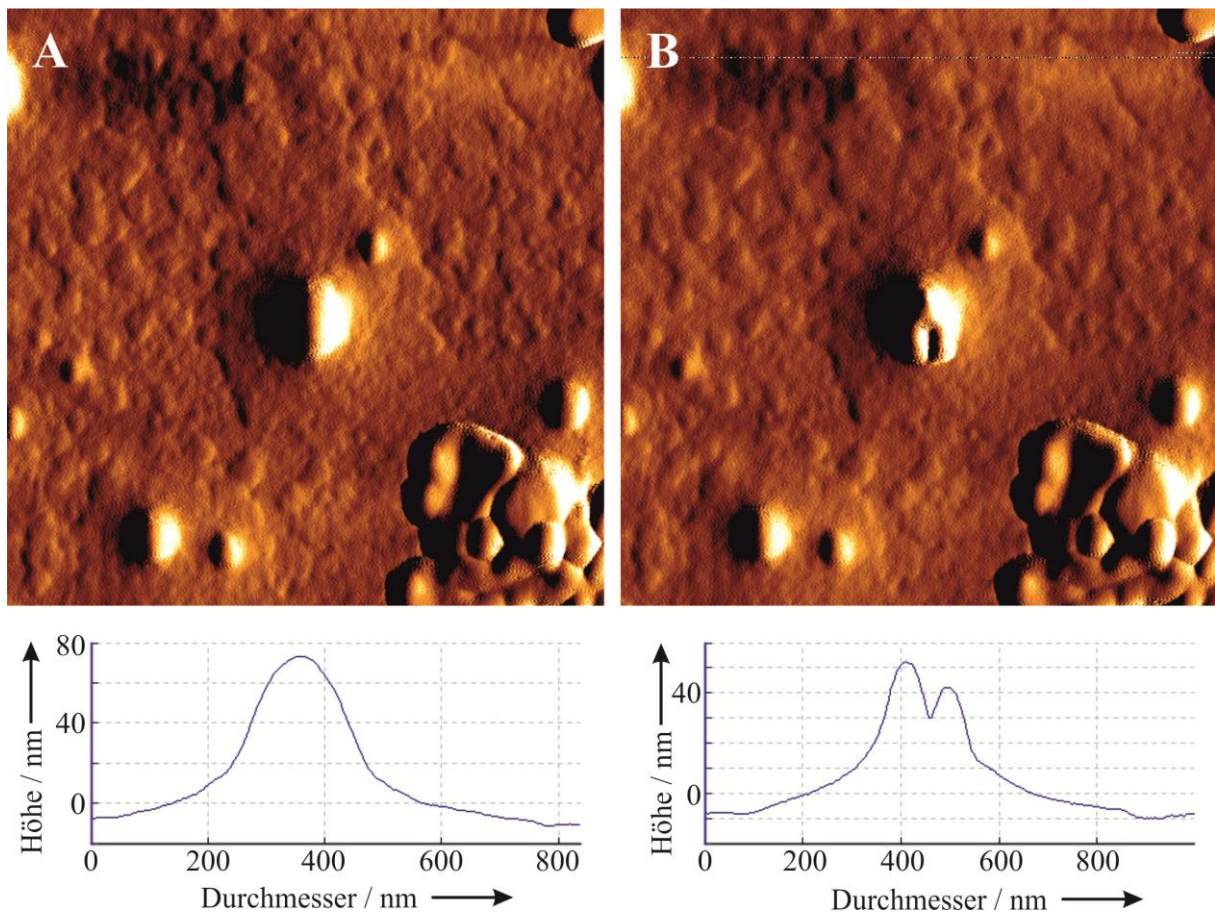
**Abbildung 25:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1)*O*-Phospho-L-Tyrosin bei verschiedenen Vergrößerungen.

Durch die Rasterelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Hohlpartikel monodispers mit einer Größe zwischen 200-250 nm vorliegen und aus 10-30 nm kleinen primären Calciumphosphat-Nanopartikeln bestehen. Weiter konnten einige aufgebrochene Partikel gefunden werden, was auf den hohlen Charakter der Partikel zurückzuführen ist.



Neben der Rasterelektronenmikroskopie wurde auch die Rasterkraftmikroskopie (AFM) zur Abbildung der Hohlpartikel verwendet. Die AFM ist eine weitere Untersuchungsmethode, die abgesehen von der Abbildung der Hohlpartikel durchgeführt wurde, um die Hohlpartikel mittels *Nanoindentation* einzudrücken. Die *Nanoindentation* ist ein Verfahren zum Nachweis von hohlen Strukturen mittels AFM.<sup>[111, 112]</sup>

In **Abbildung 26 A** ist ein mit 1,5 mM (1:1) TyrP hergestelltes Calciumphosphat-Hohlpartikel vor dem Eindrückversuch zu sehen. Anhand des Höhenprofils des Partikels kann ein Partikeldurchmesser von 250 nm bestimmt werden.



**Abbildung 26:** Rasterkraftmikroskopische Abbildung mit Höhenprofil von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin A) vor dem Eindrückversuch und B) nach dem Eindrückversuch.

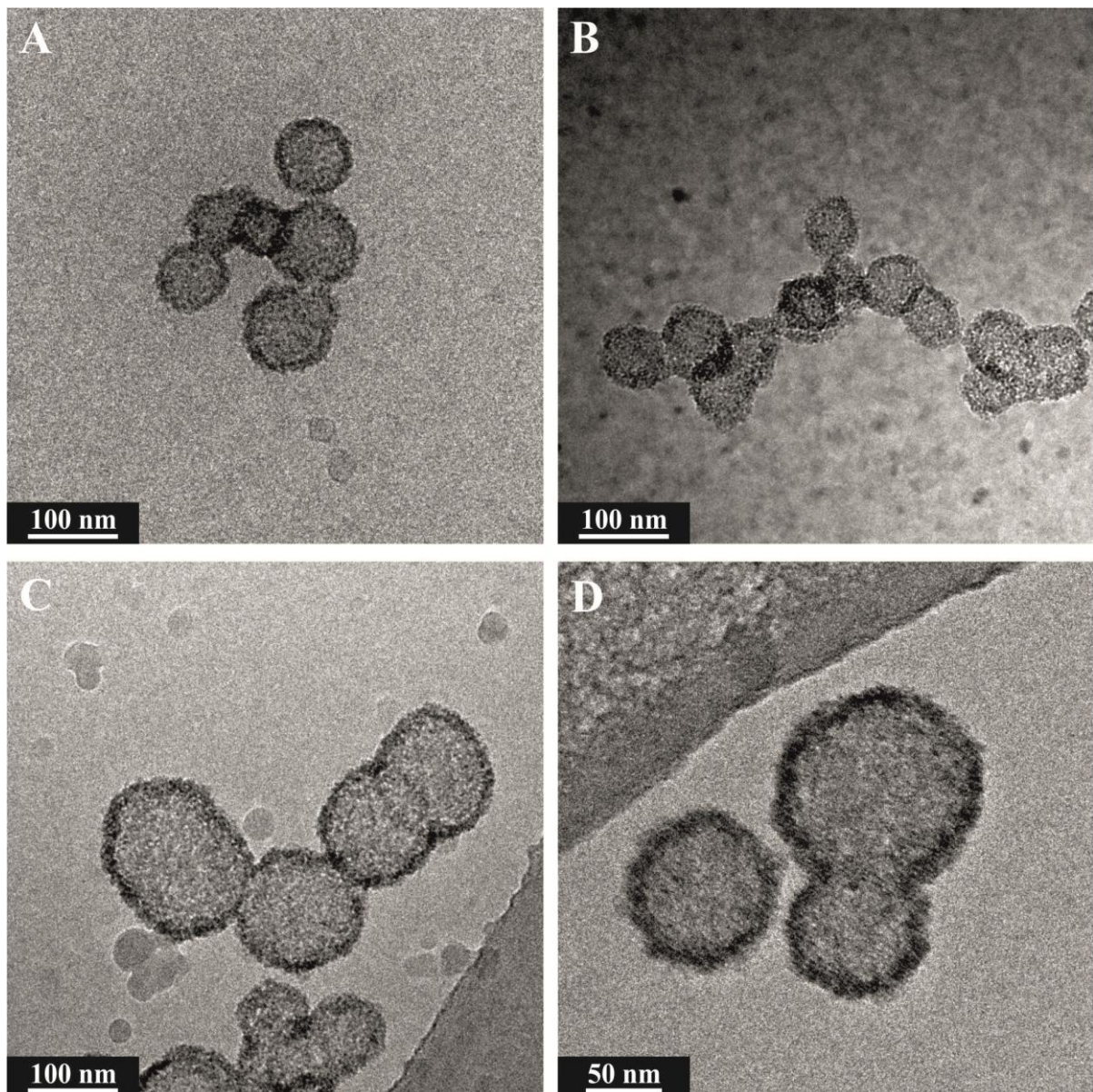


**Abbildung 26 B** zeigt das gleiche Partikel nach dem Eindruckversuch. Hier ist sowohl im AFM-Bild als auch im Höhenprofil die Eindruckstelle deutlich zu sehen; eine Größenänderung ist nicht zu beobachten. Durch die *Nanoindentation* konnte gezeigt werden, dass es sich bei den im REM beobachteten aufgebrochenen Partikeln nicht um ein Trocknungsartefakt handelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den hergestellten Partikeln um hohle Partikel handelt.

Zur Abbildung der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, wurde auch die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) verwendet. Mit der Kryo-TEM können die Hohlpartikel als Abbild der Dispersion gezeigt werden, da die Dispersion eingefroren und im gefrorenen Zustand analysiert wird. Da die Dispersionen, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, eingefroren werden, kann die Länge der Reaktionszeit auf dem Probenträger variiert und so die Reaktion zu jeder beliebigen Zeit gestoppt werden. So sollte neben eines weiteren Nachweises, dass die Partikel hohl sind, auch versucht werden, die Bildung der Hohlpartikel zu zeigen. Diese Bildung konnte nur teilweise aufgeklärt werden, da, wie in **Abbildung 27 A** zu sehen ist, schon nach 25 s erste Hohlpartikel beobachtet wurden. Die Größe der Partikel beträgt um die 100 nm. Neben der Größe der Partikel konnte durch die dunkle Ringstruktur gezeigt werden, dass die Partikel hohl sind. Diese Ringstruktur ist ein typisches Erscheinungsbild von Hohlpartikeln in der Kryo-TEM.<sup>[98]</sup> Die Ringstruktur entspricht der Wandstärke der Hohlpartikel und liegt in allen Abbildungen bei 10 nm. In **Abbildung 27 B** sind Hohlpartikel nach 5 min Reaktionszeit mit einer Größe von ca. 100 nm zu sehen. Die Wandstärke ist unverändert bei 10 nm. In **Abbildung 27 C** sowie in **Abbildung 27 D** sind Hohlpartikel nach 15 min Reaktionszeit, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, gezeigt. Die Größe der Partikel ist mit der gestiegenen Reaktionszeit auf 200 nm angewachsen. Die Hohlpartikel liegen monodispers vor. Die Wandstärke liegt

zwischen 10-30 nm.

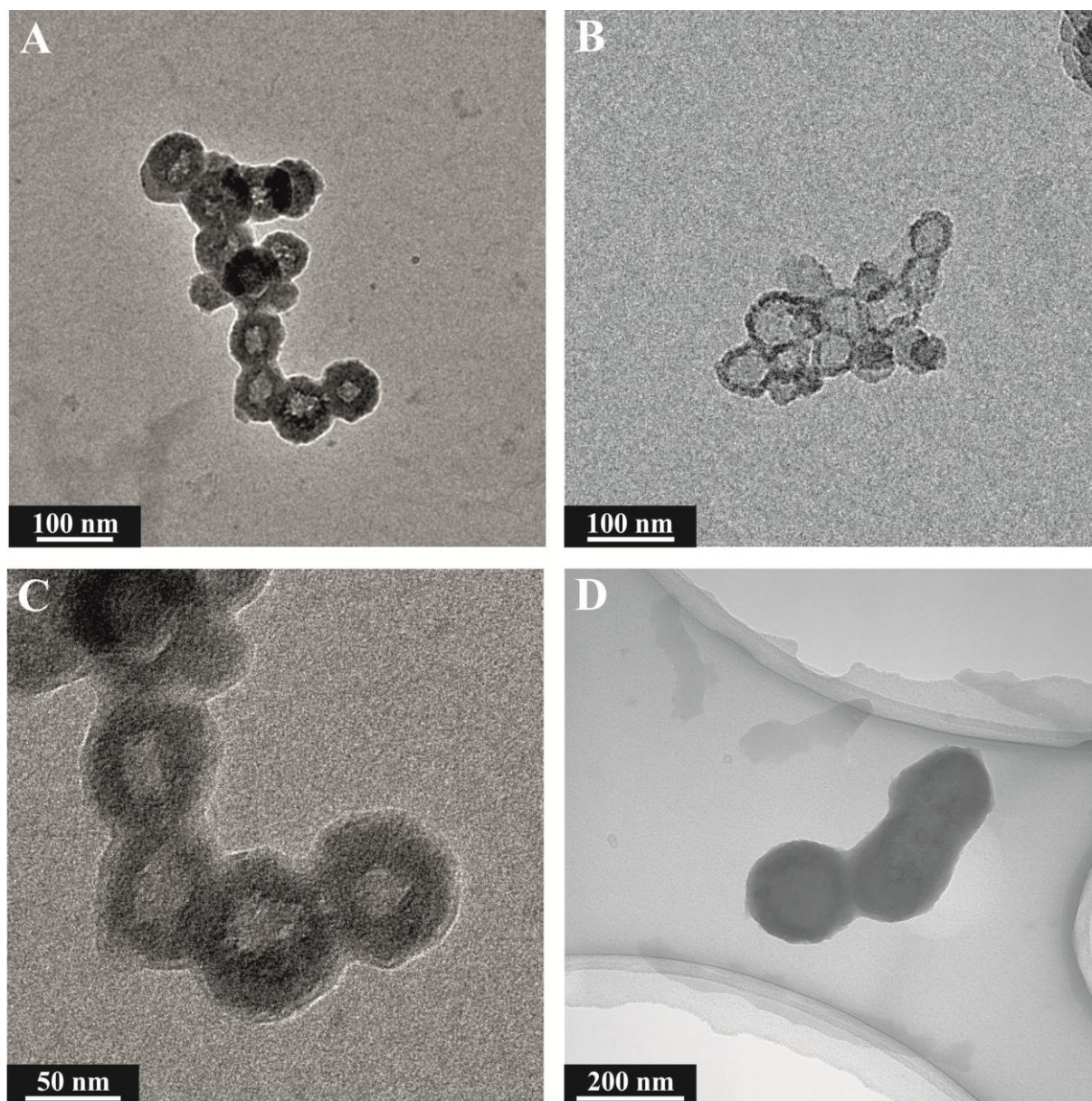
In **Abbildung 27 D** ist eine Fusion von 2 Hohlpartikeln zu sehen. Durch die Fusion wächst die Größe der Partikel auf 200-250 nm an und ist ein möglicher Teil des Bildungsmechanismus. Die Daten aus den Kryo-TEM-Untersuchungen stimmen nach 15 min Reaktionszeit mit den Daten von DLS, NTA, REM und AFM überein. Mittels der NTA konnten, wie auch im Kryo-TEM gezeigt, kleinere Partikel mit einer Größe von 100-150 nm beobachtet werden.



**Abbildung 27:** Kryo-TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin A) nach 25 s, B) nach 5 min C) und D) nach 15 min Reaktionszeit.



Neben den Kryo-TEM-Untersuchungen wurden auch TEM-Bilder von eingetrockneten Hohlpartikeln angefertigt.

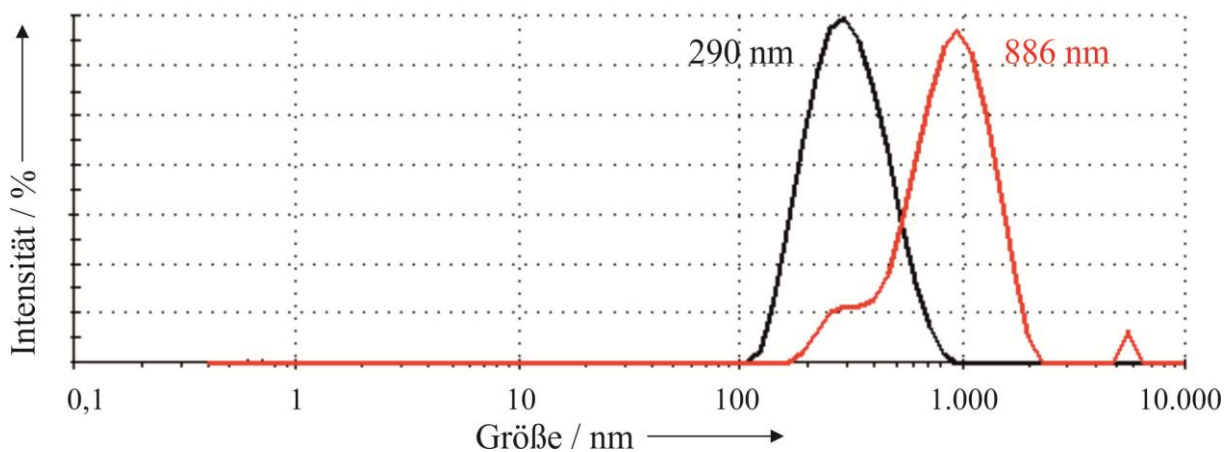


**Abbildung 28:** TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin bei verschiedenen Vergrößerungen.

In **Abbildung 28 A bis D** sind TEM-Bilder von eingetrockneten Hohlpartikeln in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt. In den TEM-Bildern wird ebenso wie in den Kryo-TEM-Abbildungen deutlich, dass die Partikel hohl sind.

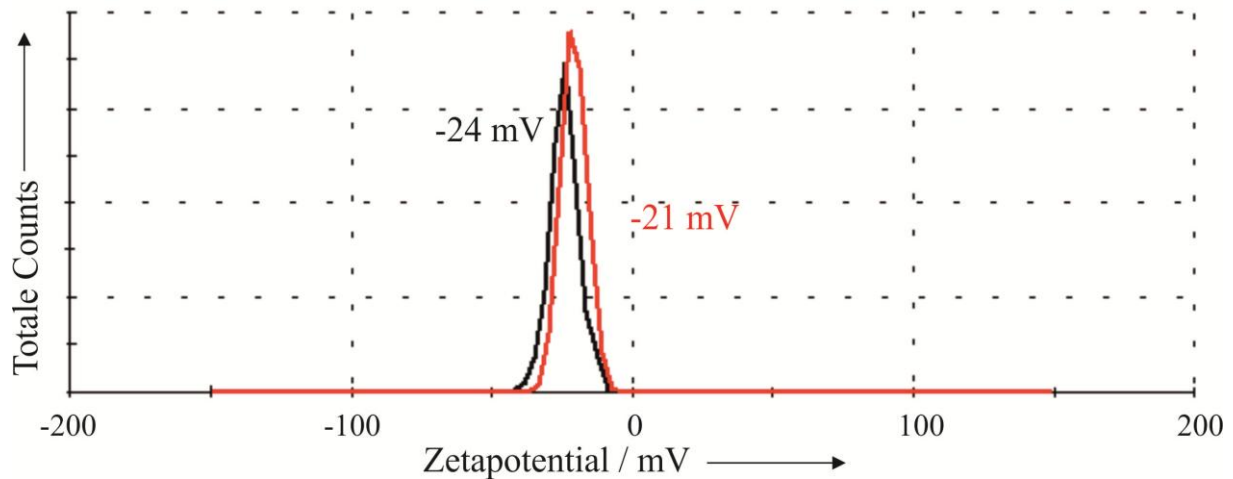
Die Größe der Partikel liegt zwischen 100-200 nm. Neben der Größe der Partikel kann auch die Wandstärke der Hohlpartikel bestimmt werden; sie liegt zwischen 30 nm und 50 nm. Die Wandstärke ist hier größer als bei den Kryo-TEM Proben, da die Proben getrocknet sind und dadurch die Wandstärke durch die Trocknung gewachsen ist. Die TEM-Untersuchungen stimmen ebenfalls mit den vorher gezeigten Daten überein.

Wie weiter oben bereits beschrieben, weisen die Hohlpartikel ein negatives Zetapotential auf, was für eine elektrostatische Stabilisierung der Partikel spricht. Um zu sehen, wie lange die Hohlpartikel in Dispersion stabil sind, wurde die Größenverteilung der Partikel nach einem Tag mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Die in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) TyrP hergestellten Partikel sind direkt nach der Herstellung 290 nm groß, wie in **Abbildung 29** gezeigt. Nach einem Tag wächst die Größe der Hohlpartikel auf 886 nm an, was auf die Agglomeration der Partikel zurückzuführen ist.



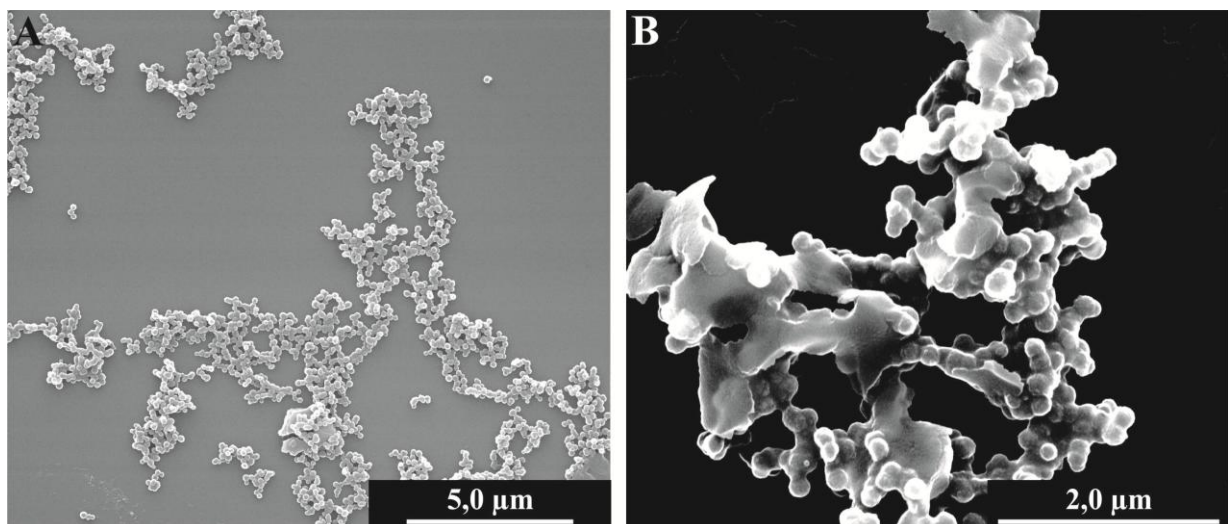
**Abbildung 29:** Größenverteilung, gemessen mittels DLS, von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin. Die schwarze Kurve zeigt die frisch hergestellten Partikel; die rote Kurve zeigt die Partikel nach einem Tag.

Wie in **Abbildung 30** zu sehen ist, ändert sich das Zetapotential nicht.



**Abbildung 30:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin. Die schwarze Kurve zeigt die frisch hergestellten Partikel; die rote Kurve zeigt die Partikel nach einem Tag.

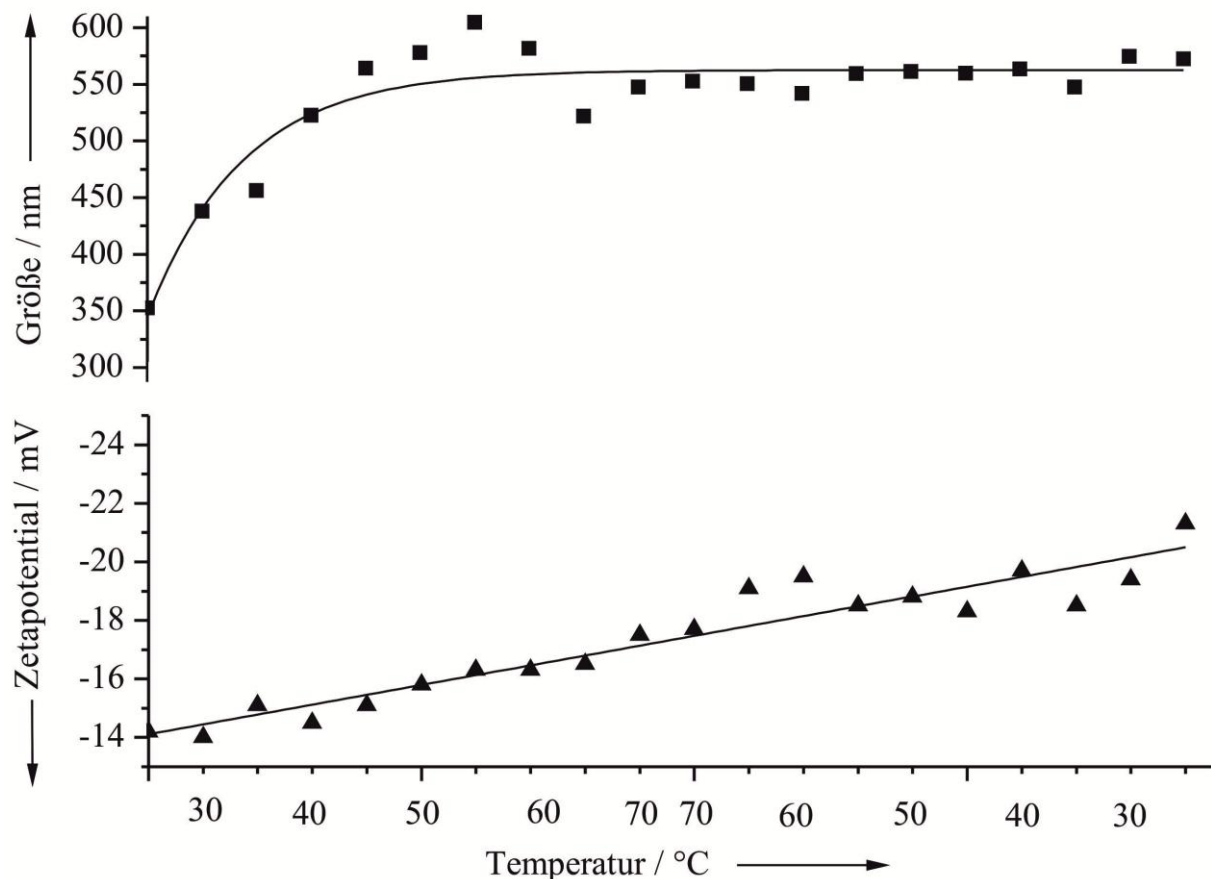
Die in **Abbildung 31** gezeigten REM-Bilder zeigen in Bild **A** frisch hergestellte Partikel und in Bild **B** Partikel nach einem Tag. Hier ist deutlich zu sehen, dass die frischen Partikel monodispers vorliegen und die einen Tag alten Partikel teilweise agglomeriert sind bzw. zerstört wurden. Die Zerstörung der Hohlpartikel nach einem Tag belegt einen metastabilen Zustand.



**Abbildung 31:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin. A) zeigt frisch hergestellte Partikel und B) zeigt Partikel nach einem Tag.

#### 5.1.1.1 Temperaturstabilität

Um weitere Informationen zur Stabilität der Hohlpartikel zu bekommen, wurde die Stabilität der Partikel gegen Temperatureinflüsse getestet. Für die Tests der Temperaturstabilität wurden die Größe und das Zetapotential der Hohlpartikel, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, mit dem Temperaturprogramm des Malvern Zetasizer Nano ZS gemessen. In **Abbildung 32** sind die Größe und das Zetapotential der Hohlpartikel in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Die dort vermessenen Hohlpartikel wurden in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin hergestellt, mit einer Heizrate von  $1,57 \text{ K min}^{-1}$  auf  $70^\circ\text{C}$  erwärmt und dort für 5 min gehalten. Anschließend wurde die Hohlpartikeldispersion mit einer Abkühlrate von  $1,67 \text{ K min}^{-1}$  auf  $20^\circ\text{C}$  abgekühlt.

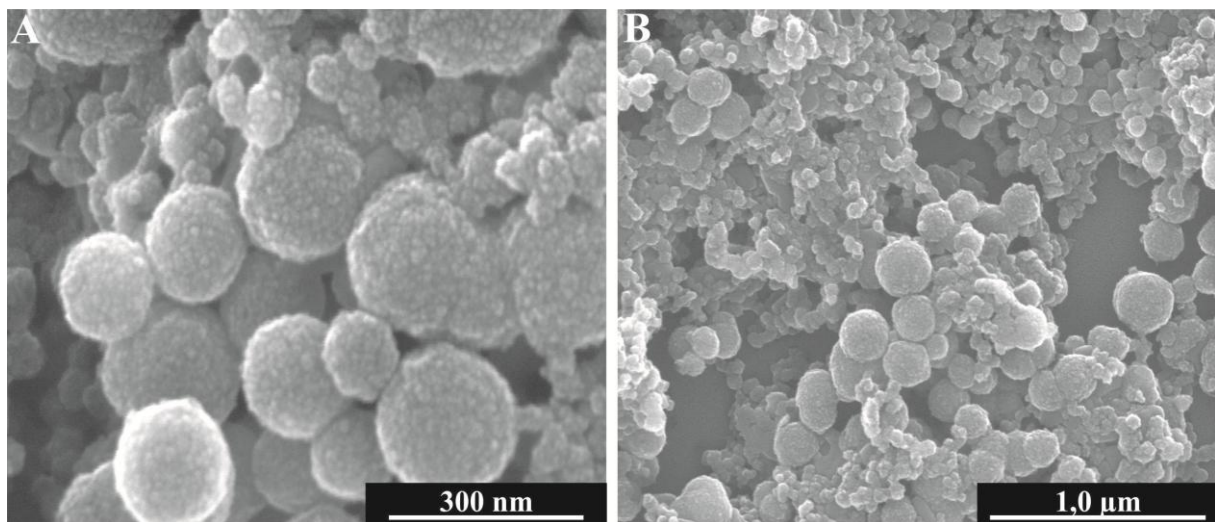


**Abbildung 32:** Größenverteilung und Zetapotential, gemessen in Abhängigkeit von der Temperatur, von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.



Im Temperaturbereich zwischen 20 °C und 65 °C ist ein Ansteigen der Größe von 350 nm auf 550 nm zu beobachten. Beim Abkühlen der Proben bleibt die Größe der Hohlpartikel nahezu unverändert bei 550 nm. Das Zetapotential fällt hingegen kontinuierlich von -14 mV auf -21 mV ab.

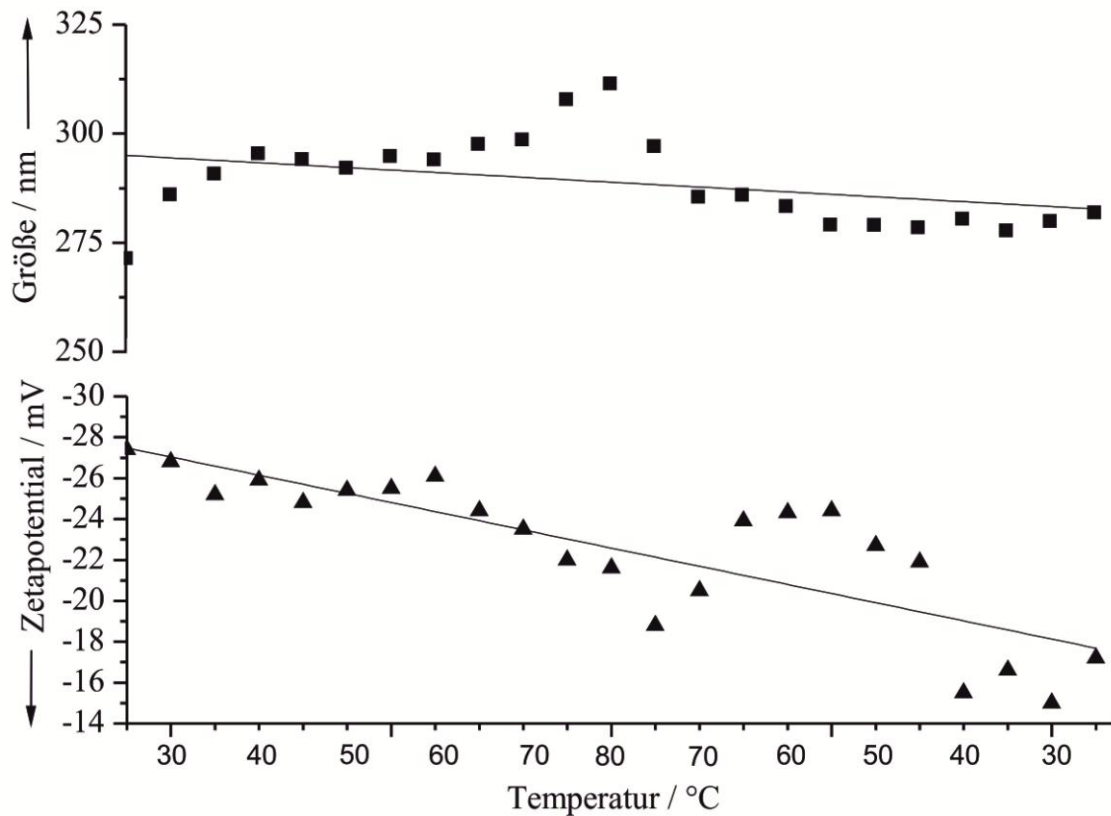
Die **Abbildung 33** zeigt, dass die Hohlpartikel für ca. 5 min gegen einen Temperaturanstieg auf von 70 °C und anschließendem Abkühlen auf 20 °C stabil sind. In Bild **A** und **B** sind zum größten Teil intakte Partikel zu sehen. Die REM-Bilder zeigen, dass die Hohlpartikel nach dem Aufheizen auf 70 °C und anschließendem Abkühlen eine Größe von 200-300 nm haben. In **Abbildung 33 A** sind sehr gut die primären Calciumphosphat-Nanopartikel zu sehen, aus denen die Hohlpartikel aufgebaut sind.



**Abbildung 33:** REM-Bilder nach dem Aufheizen auf 70 °C und anschließendem Abkühlen der Calciumphosphat-Hohlpartikeln hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Wie die Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, wurden auch die mit 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin hergestellten Hohlpartikel auf ihre Temperaturstabilität getestet. In **Abbildung 34** sind die Größe und das Zetapotential der Hohlpartikel in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Die Hohlpartikeldispersion wurde von 20 °C auf 80 °C er-

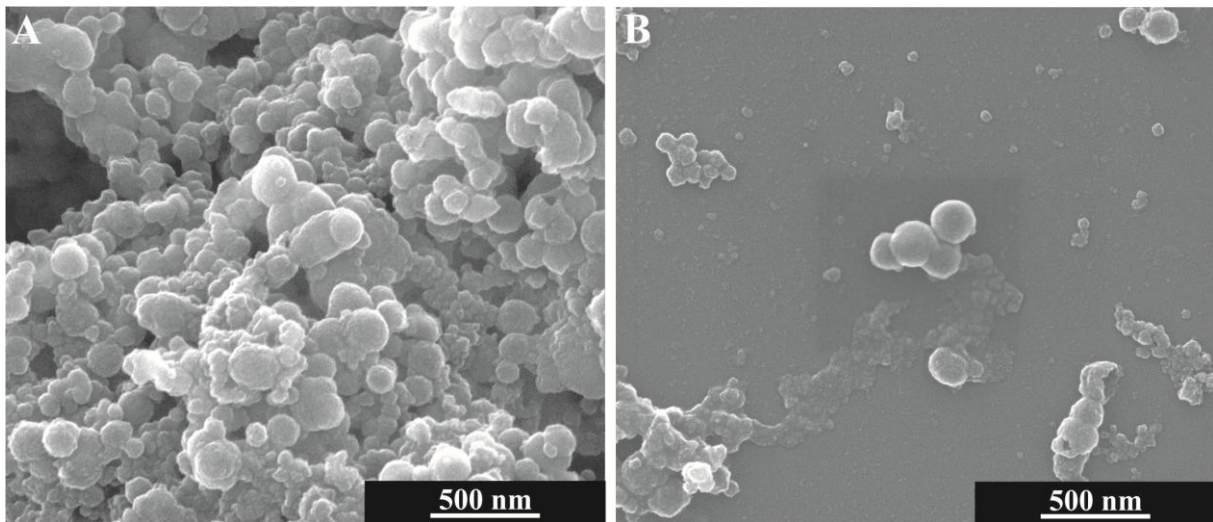
wärmt, bei 80 °C 5 min gehalten und anschließend auf 20 °C abgekühlt. Die Werte der Aufheiz- und Abkühlrate sind mit den Daten des 0,5 mM (2:1)-Ansatzes identisch.



**Abbildung 34:** Größenverteilung und Zetapotential, gemessen in Abhängigkeit der Temperatur, von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

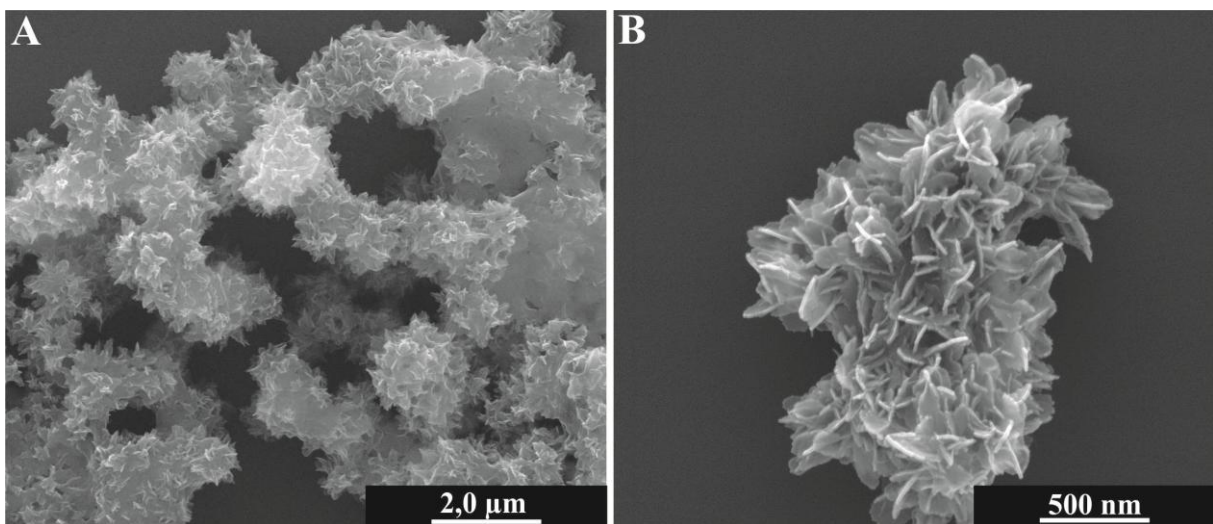
Eine Änderung der Größe der Hohlpartikel ist in Abhängigkeit der Temperatur nicht zu beobachten. Beim Zetapotential ist hingegen ein starker Anstieg von -27 mV auf -15 mV zu beobachten. Nach den Stabilitätstests gegen die Temperatur wurde die Probe mittels REM untersucht. In den REM-Bildern in **Abbildung 35** sind zum größten Teil intakte Partikel zu sehen. Die Größe der Hohlpartikel liegt zwischen 200-300 nm und stimmt mit der DLS überein. In **Abbildung 35 B** ist im unteren rechten Bildrand ein halb aufgebrochenes Hohlpartikel zu sehen. In diesem Bild sind auch die primären Calciumphosphat-Nanopartikel zu sehen.





**Abbildung 35:** REM-Bilder nach dem Aufheizen auf 80 °C und anschließendem Abkühlen der Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

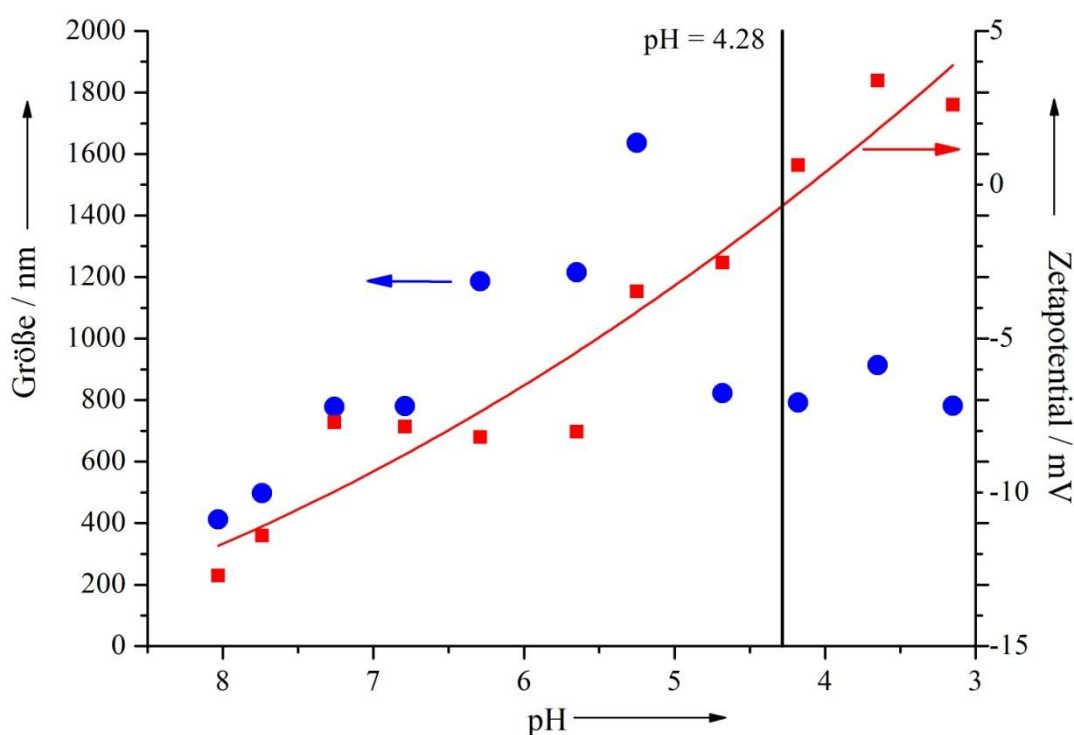
Neben den kurzzeitigen Stabilitätsversuchen gegen die Temperatur wurde eine Hohlpartikeldispersion für 1 h bei 70 °C gelagert. In **Abbildung 36** sind REM-Bilder von „Hohlpartikeln“ nach 1 h bei 70 °C gezeigt. Wie in den Bildern zu erkennen ist, sind die Hohlpartikel vollständig zerstört, und es ist eine nadel- bis plättchenförmige Morphologie zu beobachten. Diese Umkristallisation spricht ebenfalls dafür, dass die Hohlpartikel ein metastabiler Zustand sind.



**Abbildung 36:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin nach einer Stunde bei 70 °C bei verschiedenen Vergrößerungen.

### 5.1.1.2 pH-Stabilität

Abgesehen von der Temperaturstabilität ist auch die Stabilität der Hohlpartikel in Abhängigkeit des pH-Wertes von Interesse. Dazu wurde eine Hohlpartikeldispersion mit HCl durch einen Autotitrator wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben von pH = 8 nach pH = 3 titriert. Während der Titration wurde in einer Schrittweite von 0,5 jeweils die Größe und das Zetapotential bestimmt. Die Senkung des pH-Wertes erfolgte mit einer Geschwindigkeit von  $0,07 \text{ pH min}^{-1}$ . In **Abbildung 37** sind die Größe und das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt.

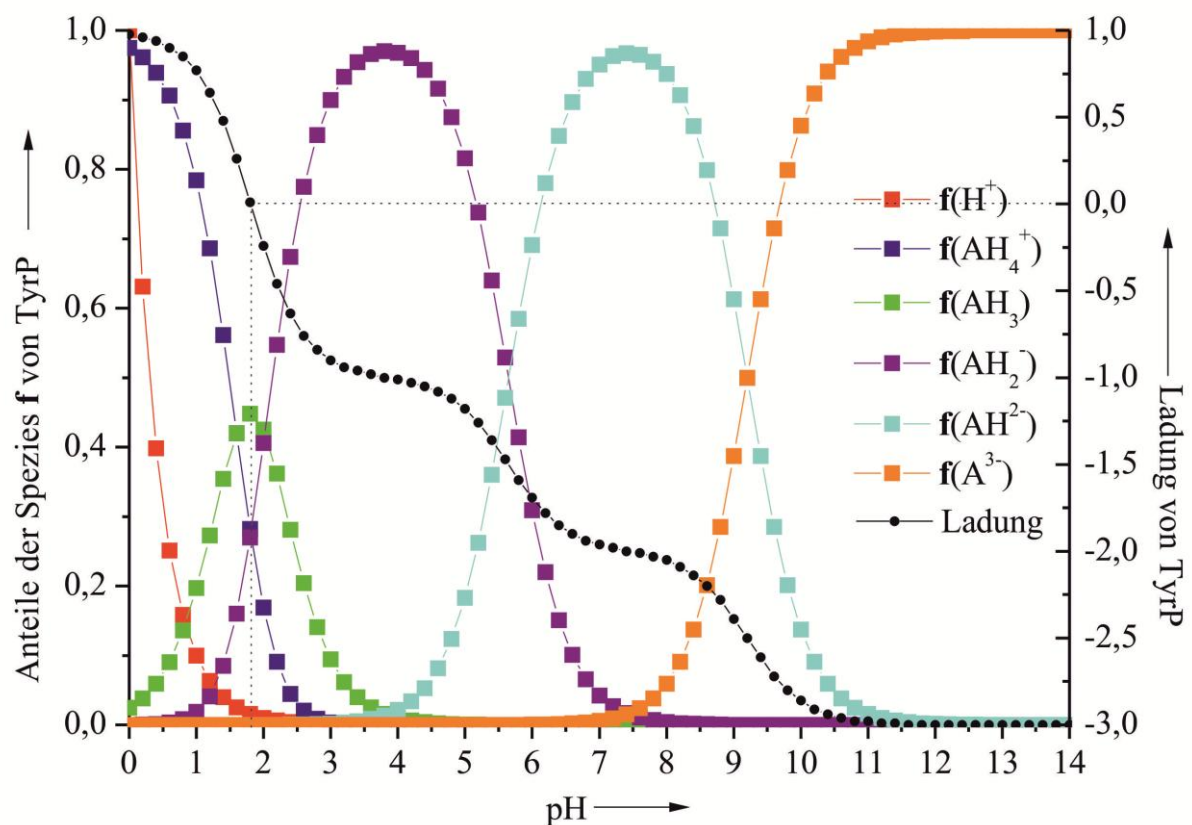


**Abbildung 37:** Größenverteilung (blau) und Zetapotential (rot), gemessen in Abhängigkeit des pH-Wertes, von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Durch die Titration steigt die Größe der Partikel von 400 nm bei pH = 8 auf  $1,7 \mu\text{m}$  bei pH = 5 an. Ab einem pH-Wert von 5,5 werden die Partikel durch ihre Auflösung schlagartig kleiner und bleiben bis pH = 3 bei einer Größe um die 800 nm.

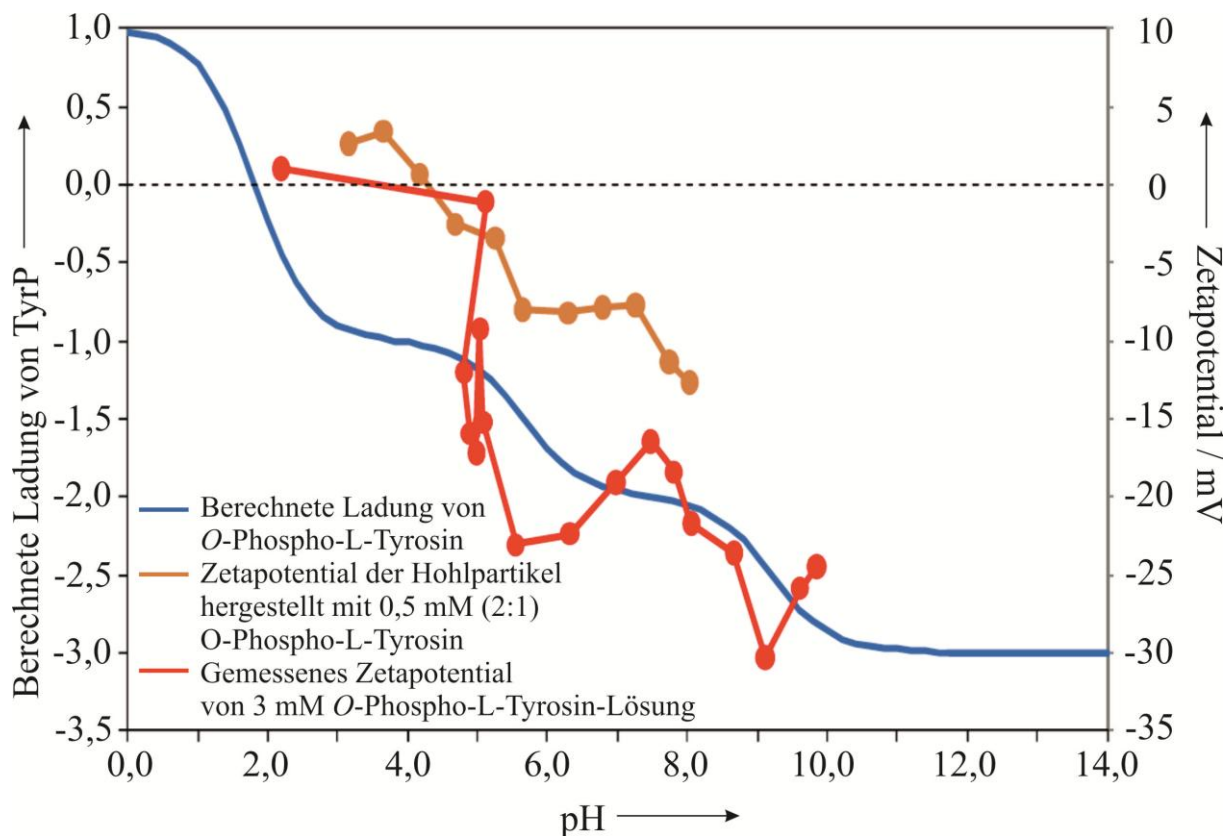
Das Zetapotential steigt mit fallendem pH-Wert von -14 mV auf +2,5 mV an. Bei dem pH-Wert von 4,28 ist das Zetapotential gleich Null, was dem isoelektrischen Punkt von *O*-Phospho-L-Tyrosin entspricht.

In **Abbildung 38** ist die theoretische Ladung und der Anteil der einzelnen Spezies (f) von *O*-Phospho-L-Tyrosin in Abhängigkeit des pH-Wertes berechnet. Die Berechnungen wurde von DA PIEDADE unter Verwendung der  $pK_s$ -Werte aus der Literatur durchgeführt.<sup>[63, 85, 90, 91, 113]</sup> Der aus der Berechnung hervorgehende isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert um pH = 1,8 sowie der durch die Titration bestimmte pH-Wert von pH = 4,28 weichen voneinander ab.



**Abbildung 38:** Berechnung der theoretischen Ladung und der Anteile der Spezies (f) von *O*-Phospho-L-Tyrosin in Abhängigkeit des pH-Wertes.

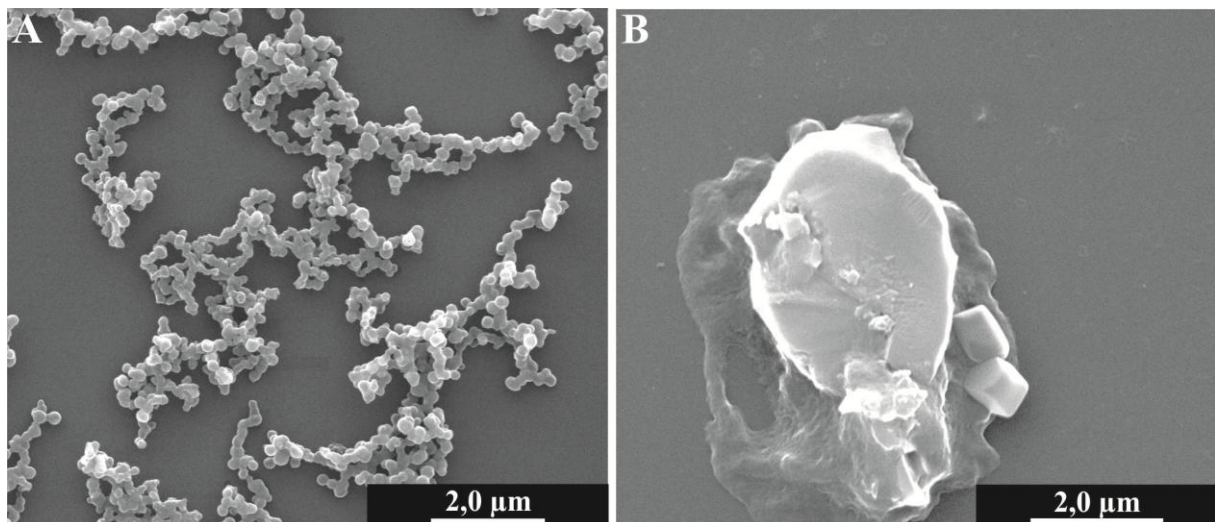
In **Abbildung 39** ist grafisch ein Vergleich der berechneten Ladung von TyrP aus **Abbildung 38**, des gemessenen Zetapotentials von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 3 mM TyrP aus **Abbildung 37**, sowie des gemessenen Zetapotentials von 3 mM TyrP-Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes gezeigt. Aus **Abbildung 39** geht hervor, dass der Kurvenverlauf der berechneten Ladung von TyrP mit dem gemessenen Zetapotential der Hohlpartikel korreliert; auch der Kurvenverlauf des gemessenen Zetapotentials von Aminosäurevesikeln einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung, die in Kapitel 5.2.1 beschrieben sind, stimmt mit dem Kurvenverlauf der berechneten Ladung überein. Anhand dieser Vergleiche kann gesagt werden, dass das gemessene Zetapotential der Hohlpartikel von der Aminosäure abhängt.



**Abbildung 39:** Vergleich der berechneten Ladung von TyrP, des gemessenen Zetapotentials von TyrP und des Zetapotentials der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von TyrP.



Von den Hohlpartikeln wurden sowohl vor als auch nach der Titration raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die in **Abbildung 40** dargestellt sind. **Abbildung 40 A** zeigt die Hohlpartikel vor der Titration bei einem pH-Wert von  $\text{pH} = 8$ , bei dem die Hohlpartikel monodispers bei einer Größe um die 400 nm vorliegen. In **Abbildung 40 B**, die nach der Titration angefertigt wurde, sind keine Hohlpartikel mehr zu sehen. Sie wurden durch die Titration vollständig zerstört. Es sind auch keine primären Calciumphosphat-Nanopartikel zu sehen, da diese bei einem pH-Wert ab ca.  $\text{pH} = 3$  aufgelöst werden. Es können jedoch NaCl-Kristalle beobachtet werden, die aus der verwendeten NaOH und der HCl entstanden sind.

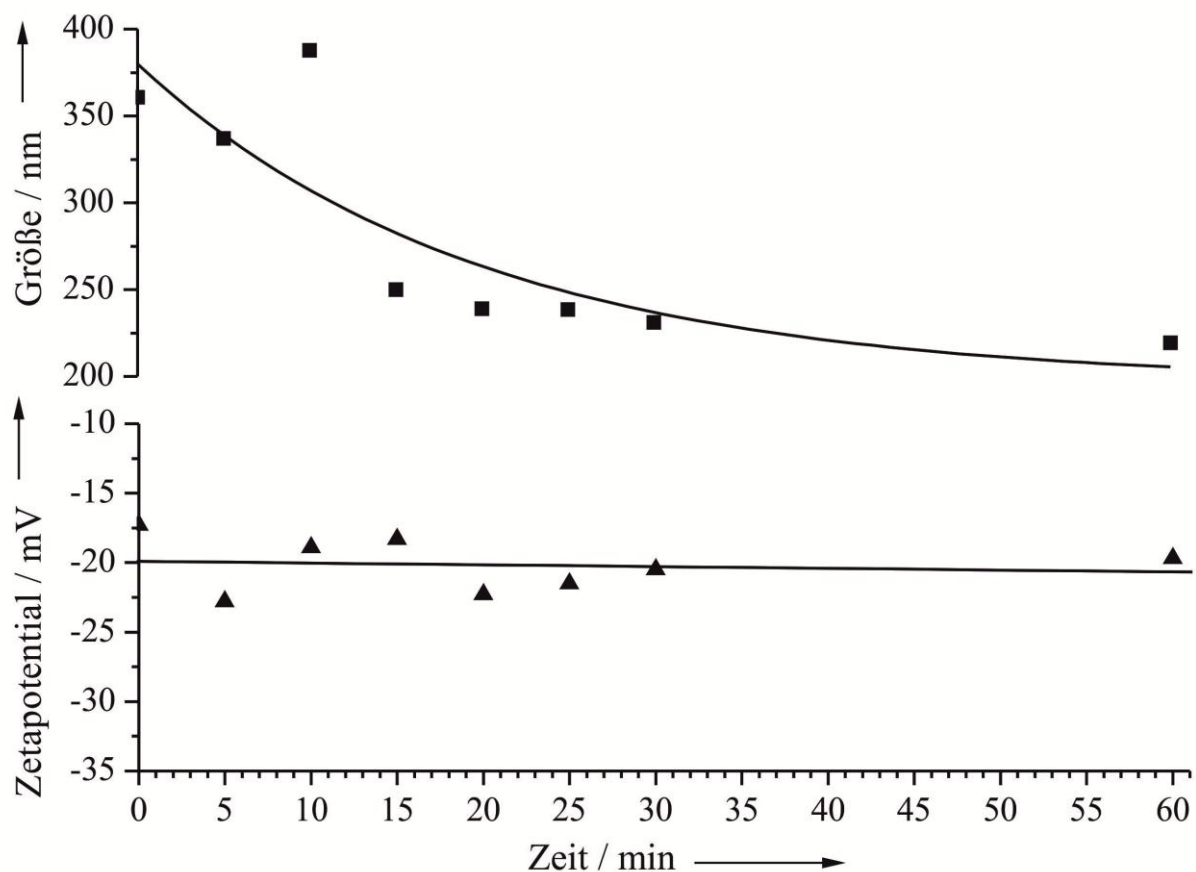


**Abbildung 40:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin. A) zeigt die Partikel bei einem pH-Wert von 8 und B) bei einem pH-Wert von 3.

Die Titration der Calciumphosphat-Hohlpartikel von  $\text{pH} = 8$  nach  $\text{pH} = 2$  hat zu einer vollständigen Zerstörung sowohl der Hohlpartikel als auch der primären Calciumphosphat-Nanopartikel geführt.

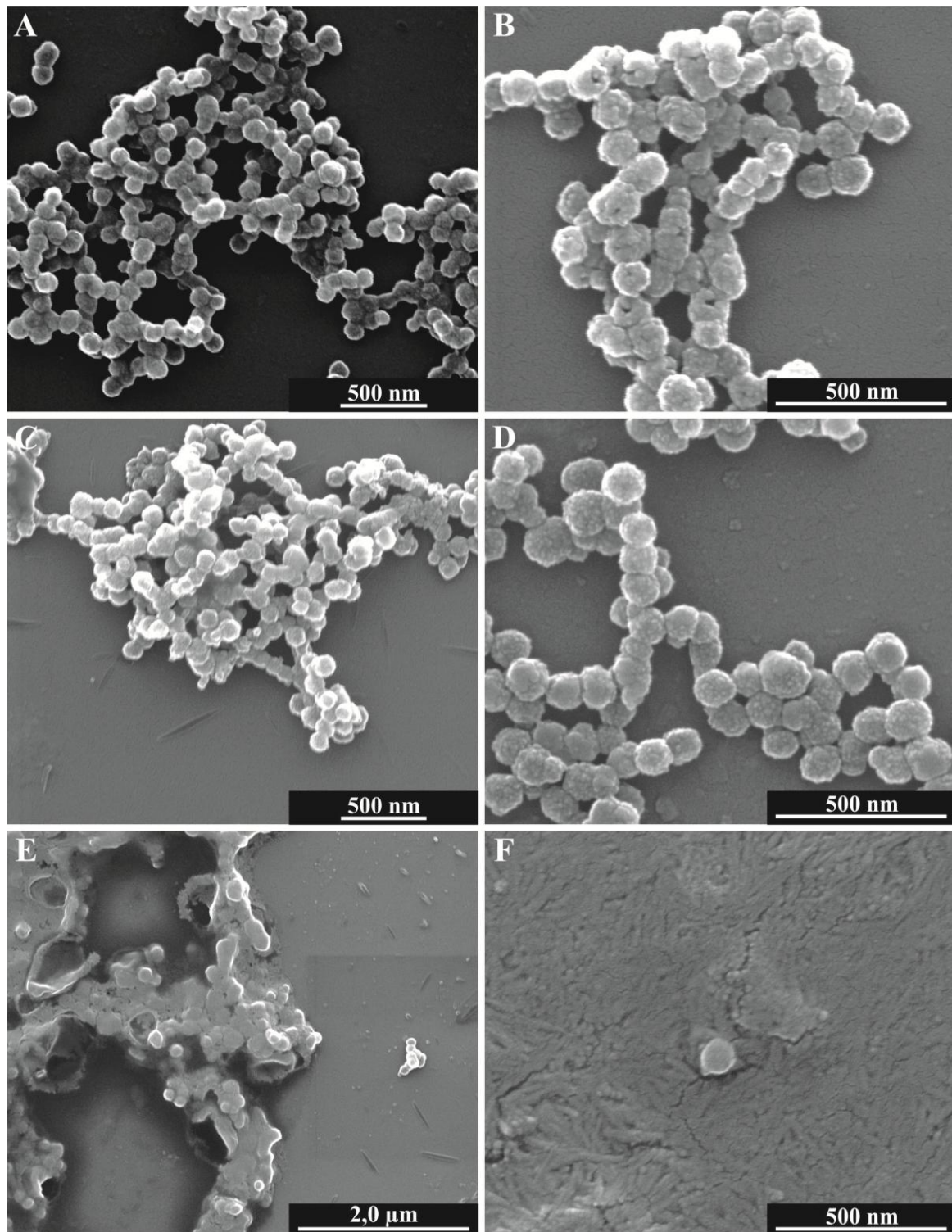
### 5.1.1.3 Stabilität gegen Ultraschall

Weiterhin wurde auch die Stabilität der Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, gegen Ultraschall untersucht. Dabei wurde in einem Zeitraum von 30 min in 5 min bzw. 10 min Abstand die Größe und das Zetapotential bestimmt. Eine weitere Messung der Größe und des Zetapotentials erfolgte nach 60 min. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben. In **Abbildung 41** sind die Ergebnisse aus der Größenbestimmung und der Messung des Zetapotentials grafisch dargestellt. Die Größe nimmt im zeitlichen Verlauf von 350 nm auf 250 nm ab. Das Zetapotential liegt bei -20 mV, es ist keine Änderung im zeitlichen Verlauf zu beobachten.



**Abbildung 41:** Größenverteilung und Zetapotential, gemessen in Abhängigkeit von der Einwirkung von Ultraschall auf die Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Zu jedem oben gezeigten Messpunkt wurden zudem rasterelektronenmikroskopische Abbildungen angefertigt.



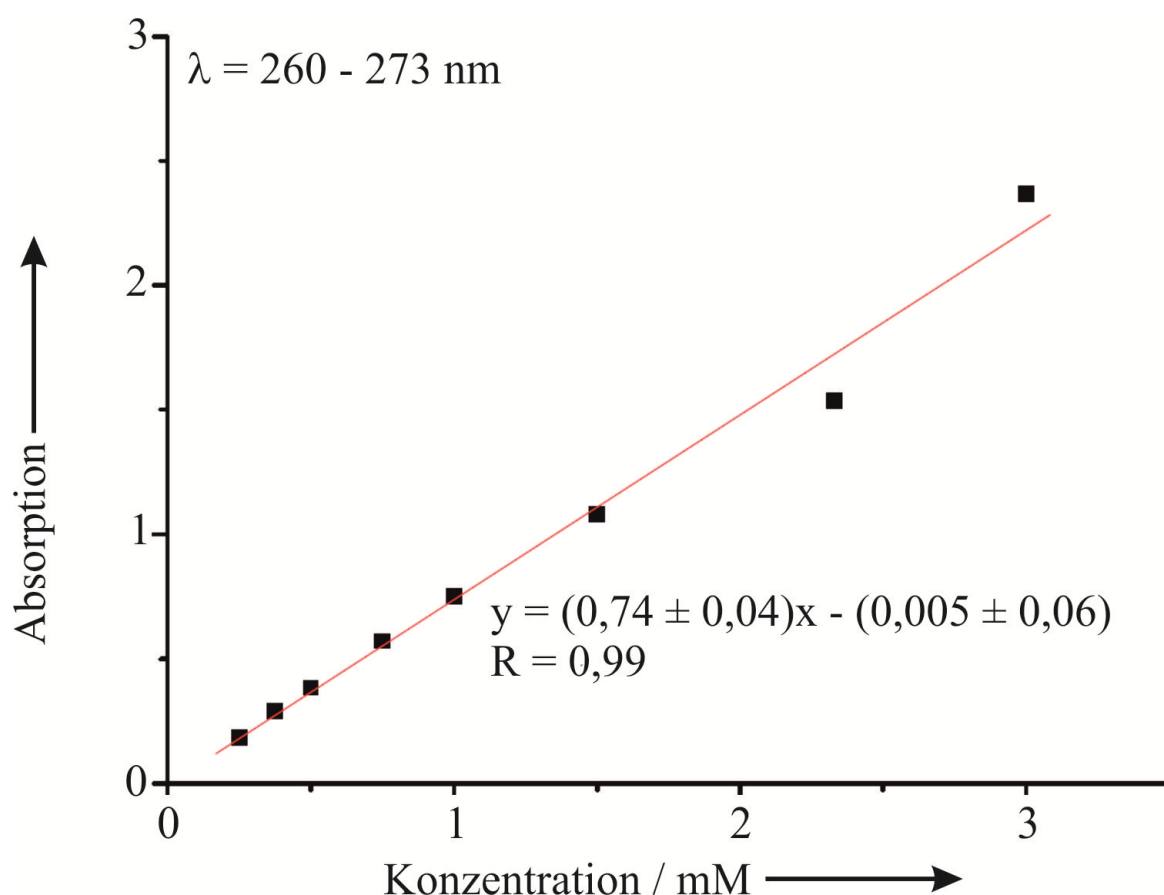
**Abbildung 42:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 3 mM 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, nach A) 0 min, B) 5 min, C) 15 min, D) 25 min, E) 30 min und F) 60 min Einwirkung von Ultraschall.

Die **Abbildung 42 A** zeigt die frisch hergestellten Hohlpartikel mit 1,5 mM (1:1) TyrP. Die Hohlpartikel liegen monodispers mit einer Größe zwischen 150 bis 200 nm vor. In **Abbildung 42 B** sind die Partikel nach 5 min Ultraschall gezeigt, es ist keine Veränderung der Größe zu sehen; die Partikel liegen weiter monodispers vor. In diesem REM-Bild sind einige aufgebrochene Partikel zu sehen, des Weiteren sind die primären Calciumphosphat-Nanopartikel, aus denen die Hohlpartikel aufgebaut sind, zu sehen. Die Größe der primären Partikel liegt bei 10 nm. Die **Abbildung 42 C** und **D** zeigen die Hohlpartikel nach 15 bzw. 25 min Ultraschall. Bei den Hohlpartikel ist weder eine Veränderung der Größe noch der Monodispersität zu beobachten. Nach 30 min Ultraschall ist eine Vielzahl der Hohlpartikel zerstört, wie in **Abbildung 42 E** zu sehen ist. Einige wenige Hohlpartikel liegen noch intakt vor. In **Abbildung 42 F** sind die Hohlpartikel nach 60 min im Ultraschallbad gezeigt. In diesem Bild sind keine hohlen Partikel zu sehen. Die primären Calciumphosphat-Nanopartikel sind zu nadelförmigen Partikeln kristallisiert. Die Hohlpartikel wandeln sich nach 60 min vollständig in nadelförmige Calciumphosphat-Partikel um, was auch hier dafür spricht, dass die Hohlpartikel einen metastabilen Zustand darstellen. Da es bei der Ultraschallung der Proben auch zu einem Temperaturanstieg kommt, kann dieser die Zerstörung der Hohlpartikel beschleunigen. Die Hohlpartikel sind, wie in Kapitel 5.1.1.1 gezeigt, nur kurzzeitig bei höheren Temperaturen stabil.



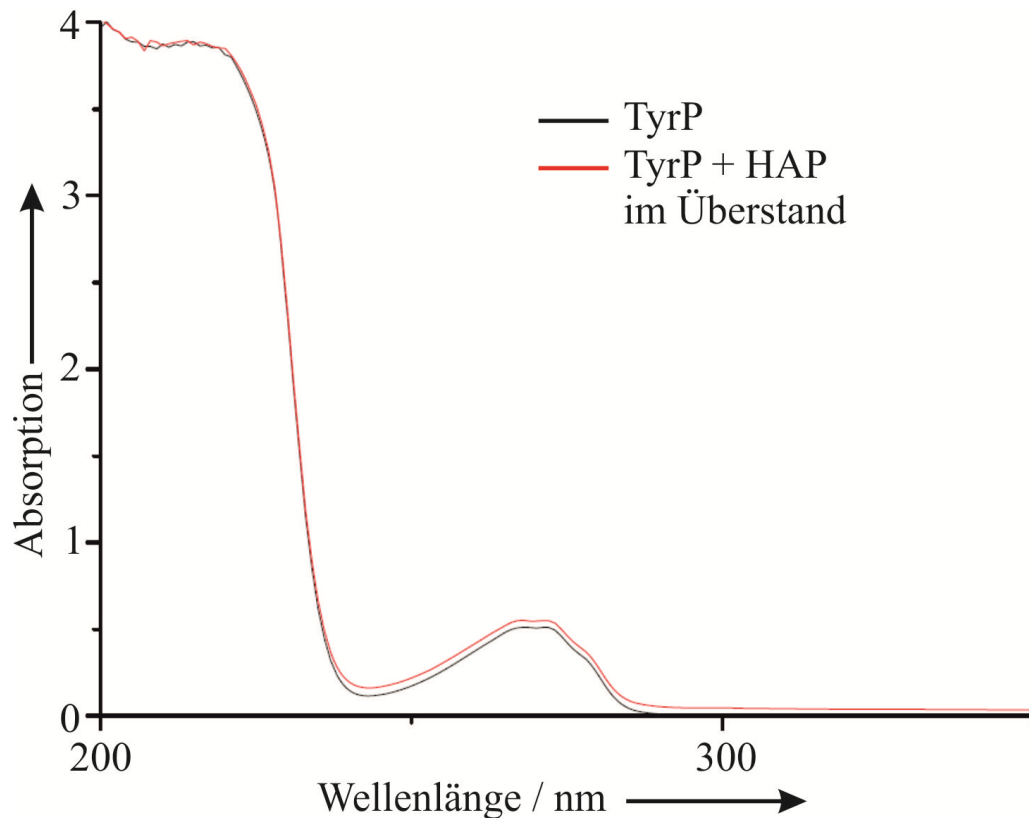
#### 5.1.1.4 Absorptionsverhalten von TyrP an HAP

Zur Analyse des in den Calciumphosphat-Hohlpartikeln enthaltenen *O*-Phospho-L-Tyrosins wurde zuerst die UV-Absorption von *O*-Phospho-L-Tyrosin in Abhängigkeit von der Konzentration bei einer Wellenlänge  $\lambda$  zwischen 260 nm und 273 nm bestimmt. In **Abbildung 43** ist die UV-Absorption grafisch dargestellt.



**Abbildung 43:** UV-Absorption von *O*-Phospho-L-Tyrosin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Um die Adsorption von Aminosäuren an Hydroxylapatit zu untersuchen, wurde eine *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung mit Hydroxylapatit (HAP) versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde der HAP abzentrifugiert und der Überstand mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Das UV-Spektrum des Überstandes wurde mit dem UV-Spektrum der reinen *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung verglichen. Diese Spektren sind in **Abbildung 44** dargestellt.

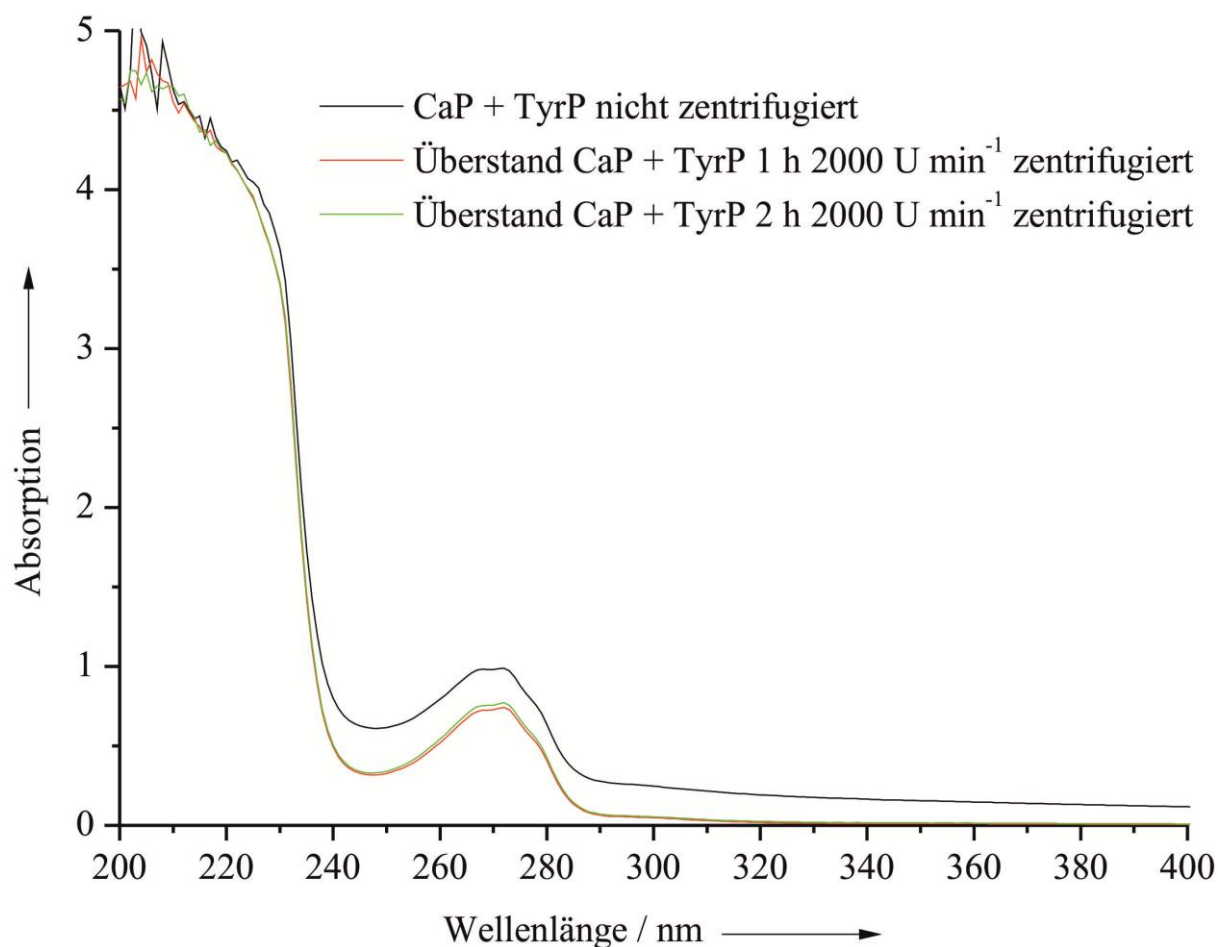


**Abbildung 44:** UV/Vis-Spektren von TyrP und TyrP + HAP nach Zentrifugation.

Aus dem Vergleich der Spektren ist zu sehen, dass die beiden UV-Spektren nahezu identisch sind und kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist.

Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass keine Absorption von Aminosäuren an der HAP-Oberfläche stattfindet.

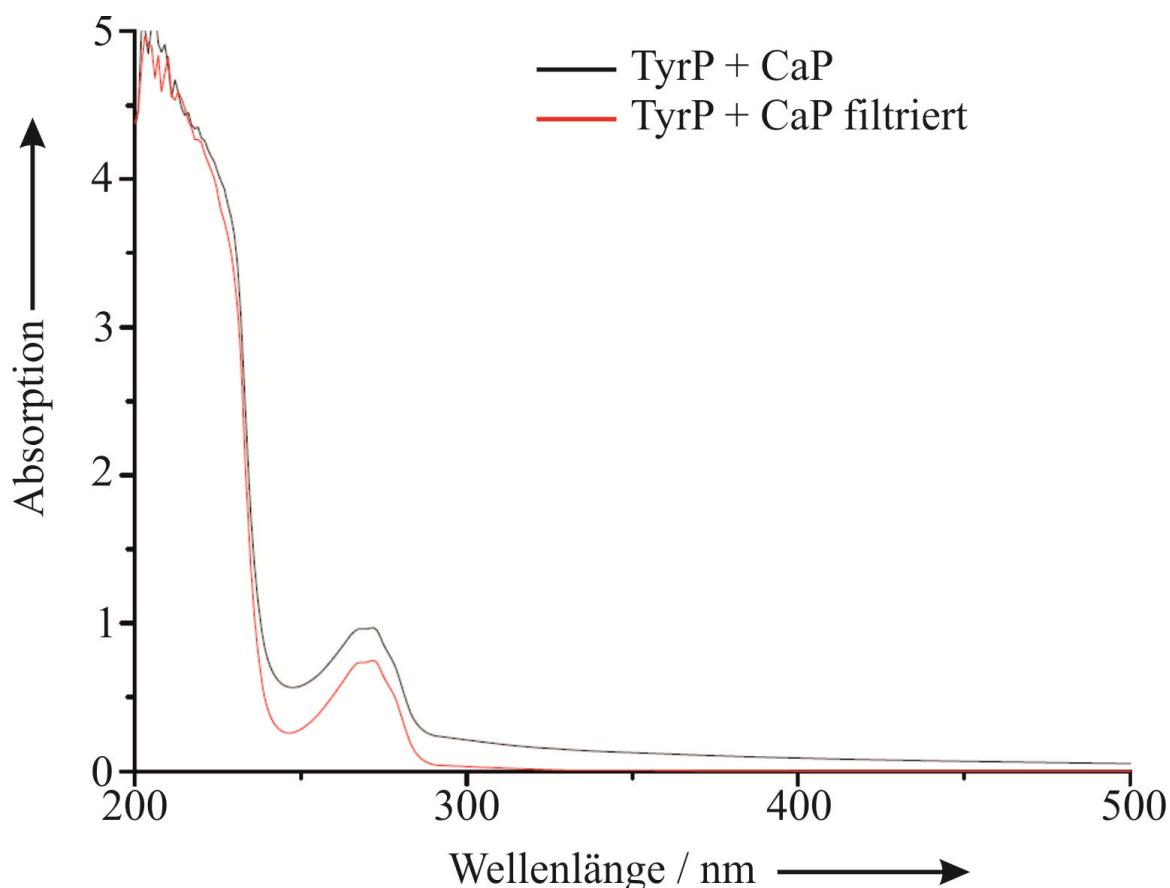
Um nun den Aminosäureanteil in den Hohlpartikeln zu bestimmen, wurde je eine Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, bei  $2000 \text{ U min}^{-1}$  für 1 h bzw. 2 h zentrifugiert. Von den so erhaltenen Überständen wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Eine weitere Calciumphosphat-Hohlpartikel-Dispersion wurde zum Vergleich nicht zentrifugiert und ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. In **Abbildung 45** sind die drei UV-Spektren gezeigt.



**Abbildung 45:** UV/Vis-Spektren von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, nach der Zentrifugation.

Der Vergleich der Spektren der zentrifugierten und nicht zentrifugierten Probe zeigt eine Abnahme der Absorption von 22 % für die zentrifugierte Probe. Da die 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung im Volumenverhältnis 1:1 mit der Calciumphosphat-Nanopartikeldispersion gemischt wird, ergibt sich eine *O*-Phospho-L-Tyrosin-Konzentration von 1,5 mmol L<sup>-1</sup>. Aus der Abnahme der Absorption von 22 % errechnet sich so eine *O*-Phospho-L-Tyrosin-Konzentration von 1,17 mmol L<sup>-1</sup> im Überstand. Daraus folgt, dass in den Hohlpartikeln 0,33 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin enthalten sind.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Zentrifugationsversuchen wurde die gleiche Hohlpartikeldispersion mit Hilfe eines 20 nm Anotopfilters filtriert. Das Filtrat wurde anschließend mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Das Ergebnis aus dem Filtrationsversuch ist in **Abbildung 46** dargestellt.



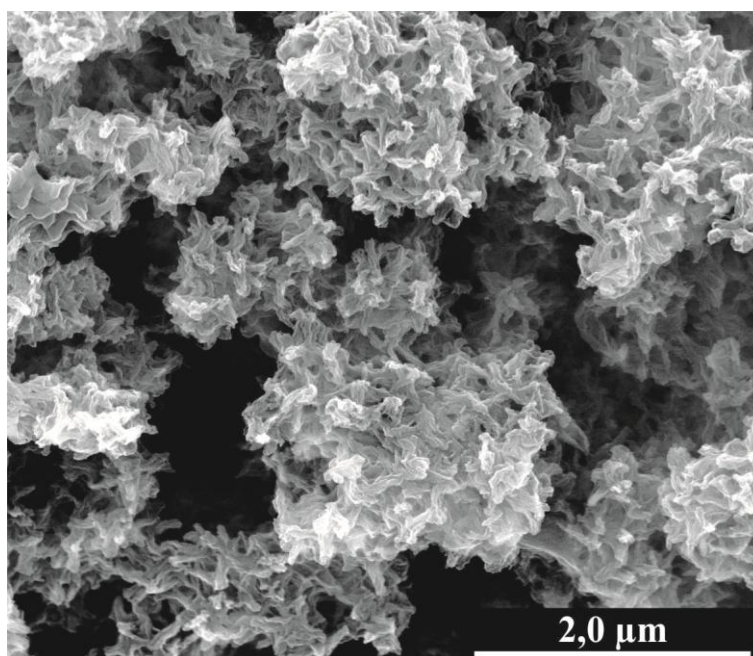
**Abbildung 46:** UV/Vis-Spektren von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin, nach der Filtration durch ein 20 nm Anotop-Filter.

Der Filtrationsversuch zeigt im Vergleich zu einer unfiltrierten Probe eine Verringerung des Absorptionsmaximums um 23 %, was mit den Daten der Zentrifugationsversuche übereinstimmt.

Vor dem Versuch wurde die Adsorption der Aminosäure an dem 20 nm Anotop-Filter geprüft, dazu wurde von einer 3 mmol L<sup>-1</sup> *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung,

vor und nach der Filtration, ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Es war keine Adsorption von *O*-Phospho-L-Tyrosin am Filter zu beobachten.

In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme in **Abbildung 47** sind Calciumphosphat-Hohlpartikel nach der Zentrifugation gezeigt. Die Partikel wurden durch die Zentrifugation vollständig zerstört. In dem REM-Bild sind keine sphärischen Hohlpartikel mehr zu erkennen. Dies war ein Grund, warum eine Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse mittels Filtration durchgeführt wurde.

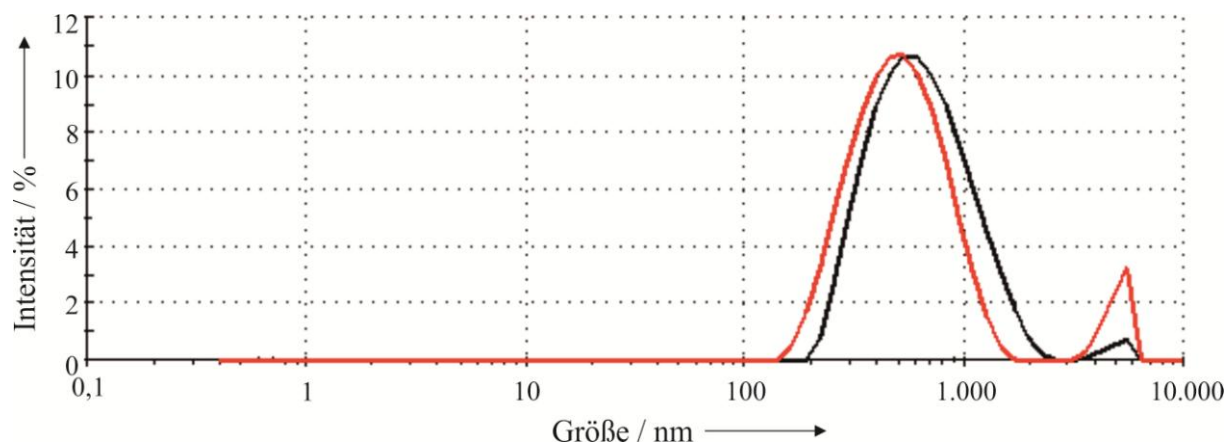


**Abbildung 47:** REM-Bild von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Tyrosin nach Zentrifugation.

Mit den Ergebnissen aus Filtration und Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass in den Calciumphosphat-Hohlpartikeln  $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  Aminosäure enthalten sind.

### 5.1.2 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L-Tyrosin (Tyr)

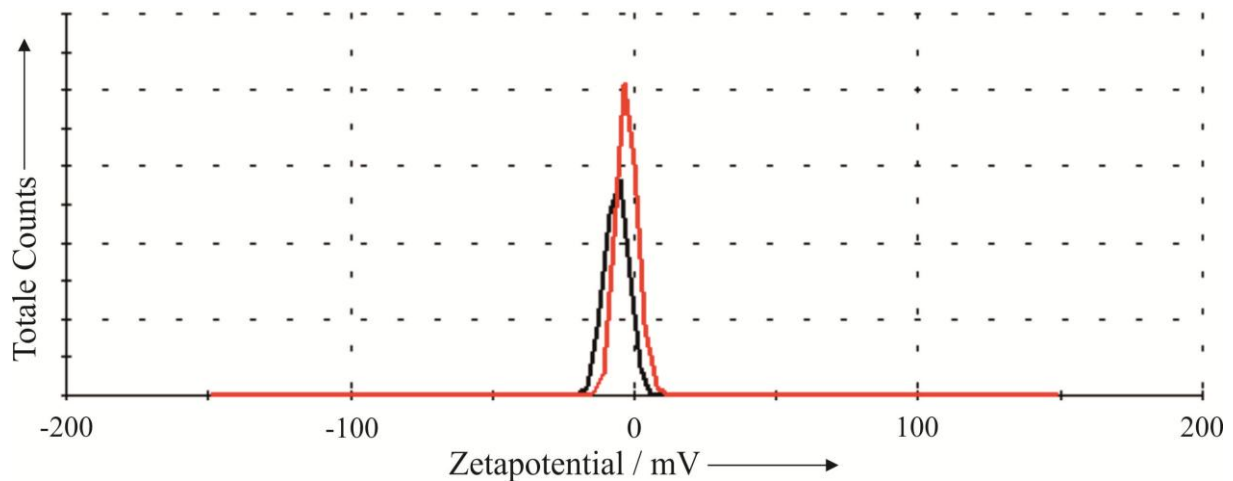
Die Herstellung der Calciumphosphat-Hohlpartikel in Gegenwart von L-Tyrosin (Tyr) wurde, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen von L-Tyrosin waren 1,5 mM (1:1) und 0,5 mM (2:1). In **Abbildung 48** ist die Größenverteilung, bestimmt mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS), der entstandenen Partikel gezeigt.



**Abbildung 48:** Größenverteilung gemessen mittels DLS von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) L-Tyrosin.

Wie in **Abbildung 48** zu sehen ist, beträgt der hydrodynamische Durchmesser der entstandenen Partikel für 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin 583 nm. Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel, die in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) L-Tyrosin hergestellt wurden, liegt bei 542 nm.

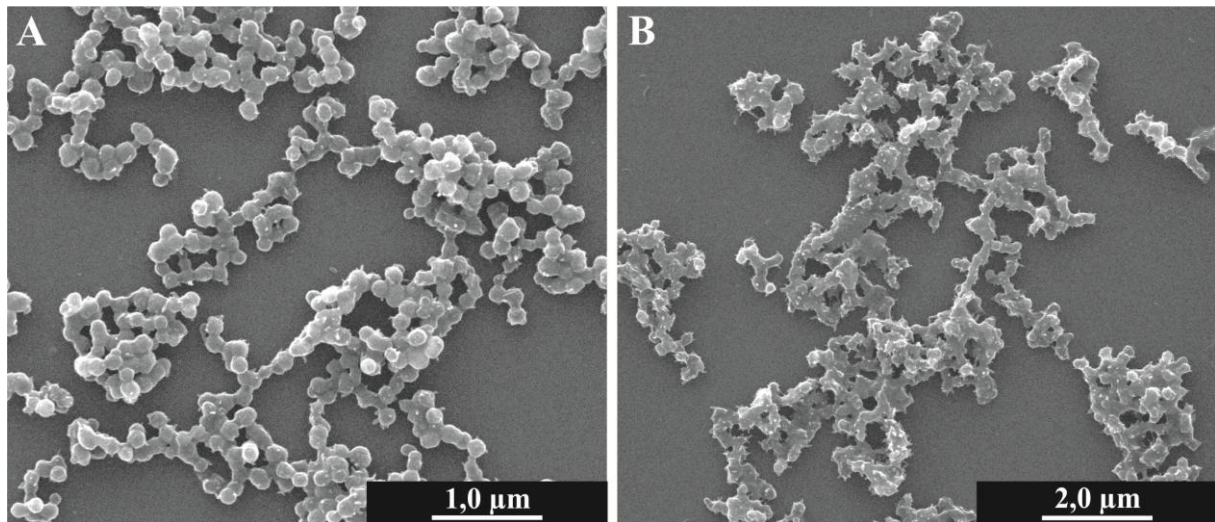
Die neben dem hydrodynamischen Durchmesser gemessenen Zetapotential sind in **Abbildung 49** gezeigt.



**Abbildung 49:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) L-Tyrosin.

Das gemessene Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin, liegt bei -6 mV. Für die Hohlpartikel, die in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) L-Tyrosin hergestellt wurden, wurde ein Zetapotential von -3 mV gemessen. Die Zetapotentiale von -3 mV und von -6 mV zeigen, dass die hergestellten Hohlpartikel in Dispersion vermutlich nur eine kurze Stabilitätsdauer aufweisen. In **Abbildung 50** sind rasterelektronenmikroskopische Bilder der Hohlpartikel, hergestellt in Anwesenheit von 0,5 mM (1:1) und 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin, dargestellt.



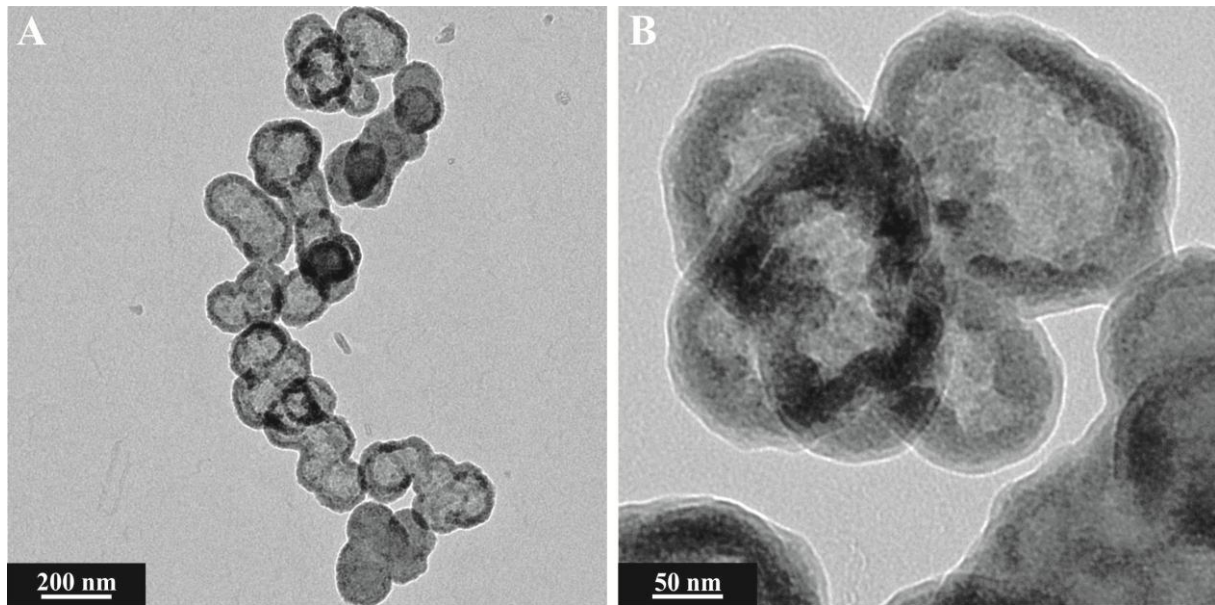


**Abbildung 50:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von A) 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin und B) 0,5 mM (1:1) L-Tyrosin.

Die **Abbildung 50 A** zeigt ein REM-Bild von Hohlpartikeln, die mit 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin hergestellt wurden. Die Hohlpartikel liegen monodispers mit einer Größe zwischen 200 und 300 nm vor. Die hier beobachtete kleinere Größe der Partikel im Unterschied zur DLS lässt sich durch die Agglomeration der Partikel in Dispersion aufgrund des geringen Zetapotentials oder der Fusion von Hohlpartikel in Lösung erklären. In der **Abbildung 50 B** sind Hohlpartikel gezeigt, die in Gegenwart von 0,5 mM (1:1) L-Tyrosin hergestellt wurden. Die Partikel liegen agglomeriert vor, was von der geringen elektrostatischen Stabilisation herrührt. Die Größe der Hohlpartikel liegt ebenfalls zwischen 200 nm und 300 nm.

Von den Calciumphosphat-Hohlpartikeln wurden auch transmissions-elektronenmikroskopische Abbildungen angefertigt. In **Abbildung 51** sind die TEM-Bilder der eingetrockneten Hohlpartikel gezeigt.



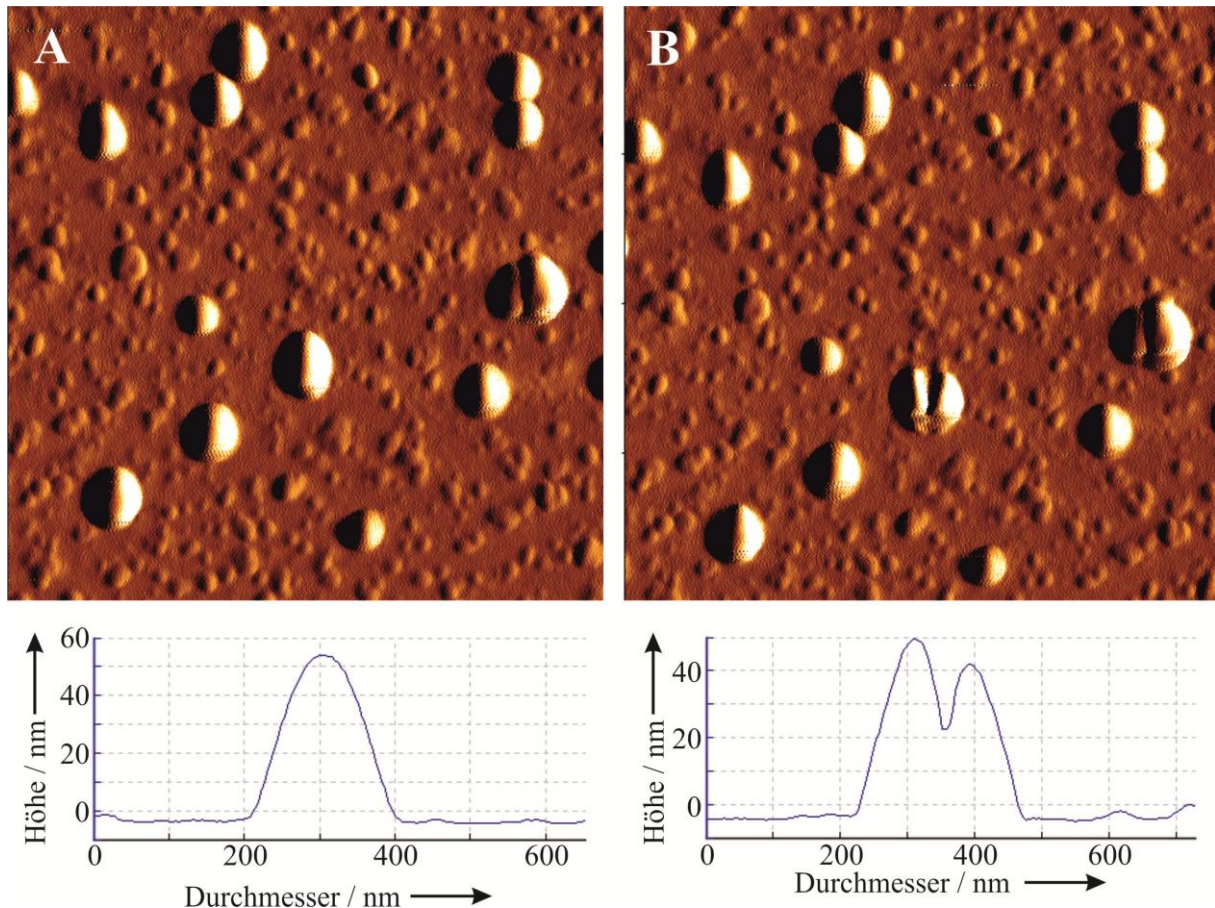


**Abbildung 51:** TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin bei verschiedenen Vergrößerungen.

Die TEM-Bilder in **Abbildung 51** zeigen, dass die mit L-Tyrosin hergestellten Partikel eine Größe zwischen 150 und 250 nm haben. Neben der Größe der Partikel wurde durch die Beobachtung der dunklen Ringstruktur gezeigt, dass die Partikel hohl sind. Die Wandstärke der Hohlpartikel liegt bei 10 nm, was mit der Wandstärke der Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart der Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin, übereinstimmt.

In der **Abbildung 51 A** kann, ähnlich wie in den Kryo-TEM-Bildern von *O*-Phospho-L-Tyrosin, eine Fusion von Hohlpartikeln beobachtet werden.

Neben der Rasterelektronenmikroskopie und der Transmissionselektronenmikroskopie wurde auch die Rasterkraftmikroskopie mit *Nanoindentation* verwendet. Mittels *Nanoindentation* sollte versucht werden, die entstandenen Hohlpartikel einzudrücken. In **Abbildung 52 A** ist ein mit 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin hergestelltes Calciumphosphat-Hohlpartikel vor dem Eindrückversuch zu sehen. Anhand des Höhenprofils des Partikels kann ein Partikeldurchmesser von 150 nm bestimmt werden.



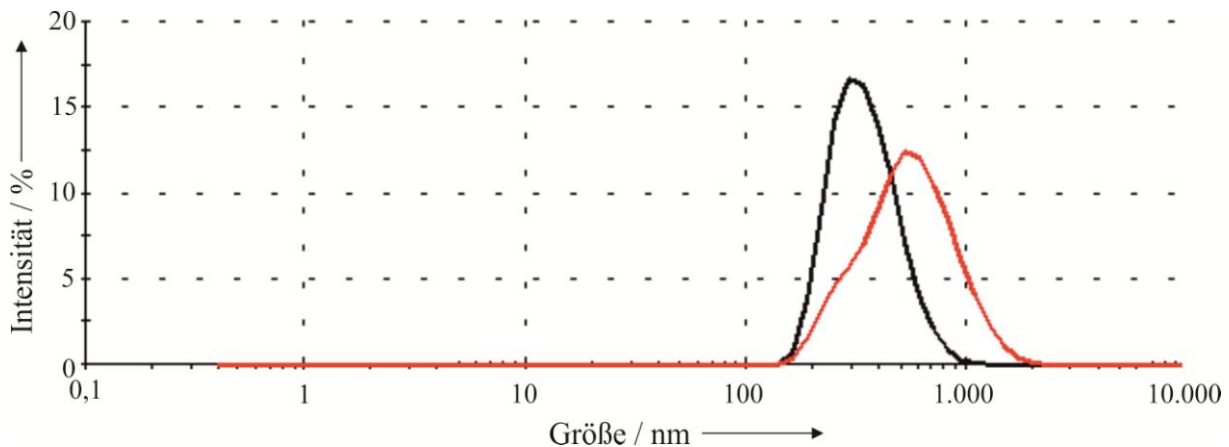
**Abbildung 52:** Rasterkraftmikroskopische Abbildung mit Höhenprofil von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Tyrosin A) vor dem Eindrückversuch und B) nach dem Eindrückversuch.

**Abbildung 52 B** zeigt dasselbe Partikel nach dem Eindrückversuch. Hier ist sowohl im AFM-Bild als auch im Höhenprofil deutlich die Eindrückstelle zu sehen; eine Größenänderung ist nicht zu beobachten. Durch die *Nanoindentation* konnte wie bei den transmissionselektronenmikroskopischen Bildern gezeigt werden, dass die Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L-Tyrosin, ebenfalls hohl sind.

Auch mit der nicht phosphorylierten Aminosäure L-Tyrosin lassen sich also Hohlpartikel mit einer Größe von 100-400 nm herstellen. Mit der Transmissionselektronenmikroskopie konnte eine Fusion der Hohlpartikel gezeigt werden. Dieses Verhalten konnte auch bei *O*-Phospho-L-Tyrosin beobachtet werden. Durch diese Fusion findet ein Partikelwachstum statt.

### 5.1.3 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von *O*-Phospho-L-Serin (SerP)

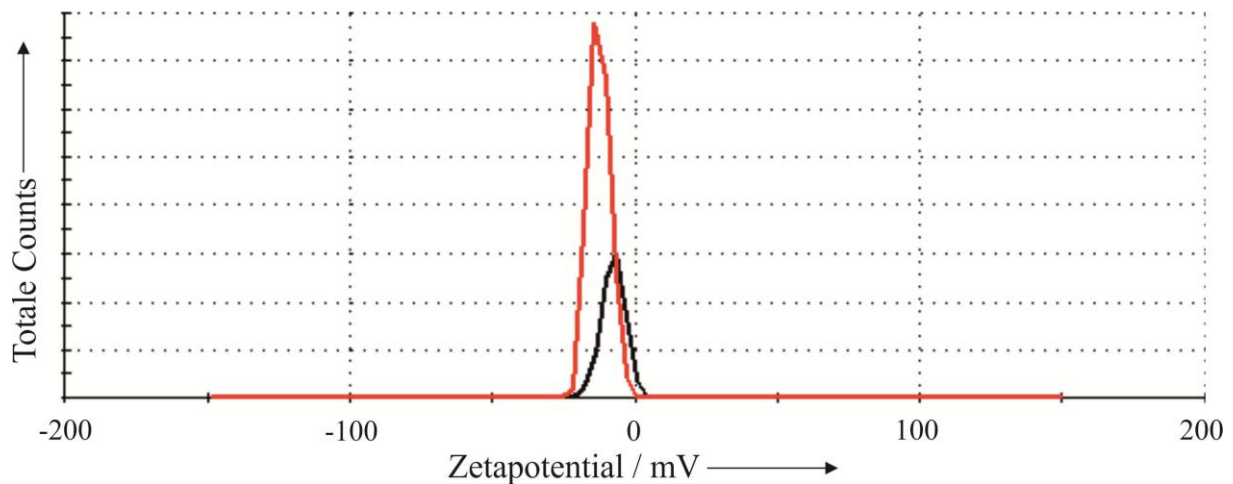
Die Calciumphosphat-Hohlpartikel wurden mit *O*-Phospho-L-Serin (SerP) hergestellt; die Konzentration von SerP betrug 1,5 mM (1:1) und 0,5 mM (2:1). In **Abbildung 53** ist die Größenverteilung der entstandenen Partikel gezeigt.



**Abbildung 53:** Größenverteilung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln gemessen mittels DLS, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (rot) und 0,5 mM (2:1) (schwarz) *O*-Phospho-L-Serin.

Der gemessene hydrodynamische Durchmesser der entstandenen Hohlpartikel liegt für den Ansatz mit 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin bei 531 nm und für den Ansatz mit 0,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin bei 295 nm.

Neben der Größe bzw. dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel wurde auch das Zetapotential gemessen, um Informationen zur Stabilität der Partikel in Dispersion zu erhalten. In **Abbildung 58** ist das Ergebnis der Zetapotentialmessung dargestellt.

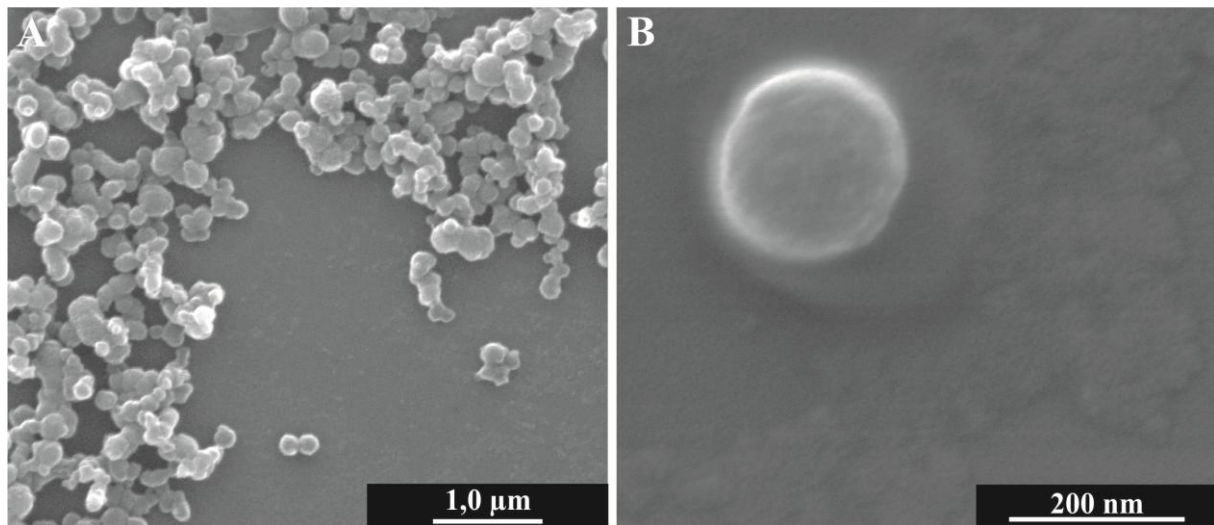


**Abbildung 54:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (rot) und 0,5 mM (2:1) (schwarz) *O*-Phospho-L-Serin.

Das gemessene Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin, liegt bei -13 mV. Für die Hohlpartikel, die in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) *O*-Phospho-L-Serin hergestellt wurden, wurde ein Zetapotential von -8 mV gemessen. Die Zetapotentiale von -13 mV und von -8 mV zeigen, dass die hergestellten Hohlpartikel eine gewisse Zeit in Dispersion stabil sein sollten. Die Dispersion mit dem Zetapotential von -13 mV sollte länger stabil sein als die mit dem Zetapotential von -8 mV.

Für die rasterelektronenmikroskopische Abbildung der Hohlpartikel wurden 20 mL der Calciumphosphat-Hohlpartikeldispersion, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin, auf einem Siliciumprobenträger eingetrocknet und anschließend im Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die entstandenen REM-Bilder sind in **Abbildung 55** dargestellt.

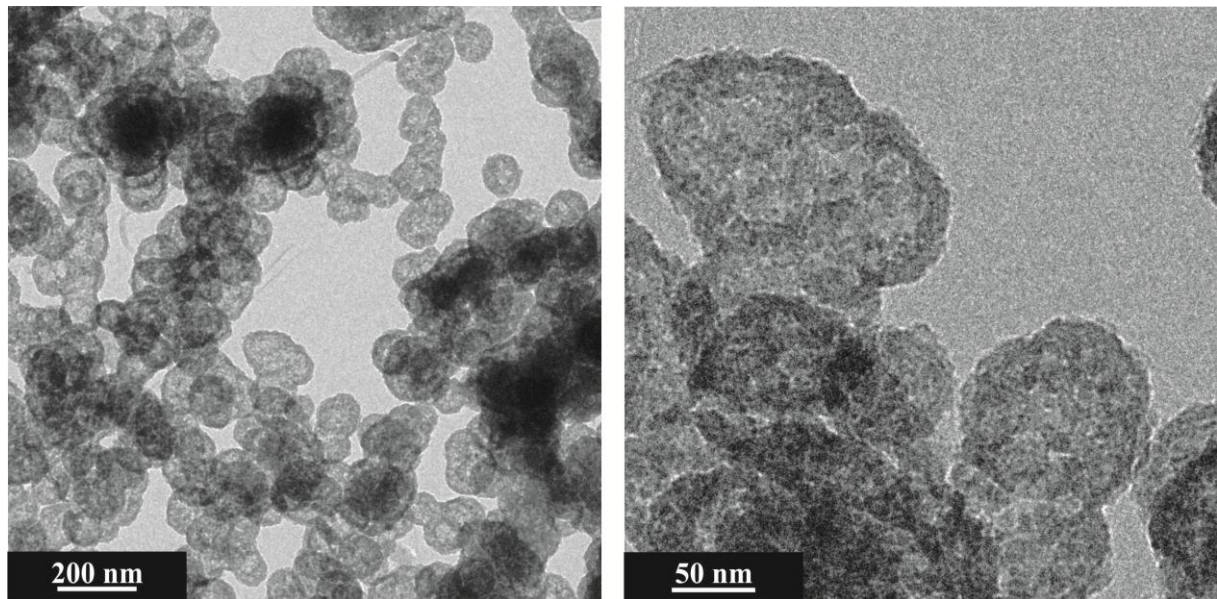




**Abbildung 55:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

Auf den REM-Bildern ist zu erkennen, dass die Hohlpartikel monodispers vorliegen. Ihre Größe liegt zwischen 200 nm und 300 nm, was mit den Daten der DLS übereinstimmt. Die **Abbildung 55 B** zeigt ein Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin. Die Größe des Partikels liegt bei 200 nm. Die REM-Bilder zeigen, dass die Hohlpartikel aus kleinen primären Calciumphosphat-Nanopartikeln mit einer Größe um die 10 nm bestehen.

Von den Calciumphosphat-Hohlpartikeln wurden neben den rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen auch transmissionselektronenmikroskopische Abbildungen angefertigt. In **Abbildung 56** sind die TEM-Bilder der eingetrockneten Hohlpartikel gezeigt.



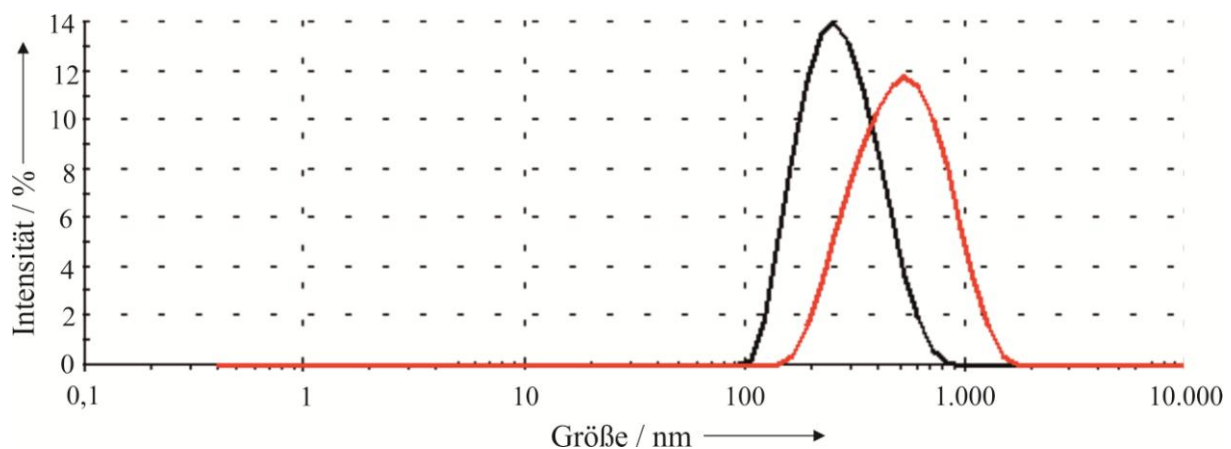
**Abbildung 56:** TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *O*-Phospho-L-Serin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

Die TEM-Bilder in **Abbildung 56** zeigen, dass die mit *O*-Phospho-L-Serin hergestellten Partikel eine Größe zwischen 100 und 200 nm haben. Neben der Größe der Partikel konnte anhand der dunklen Ringstruktur gezeigt werden, dass die Partikel hohl sind. Die Wandstärke der Hohlpartikel liegt bei 10 nm. Die Wandstärke dieser Calciumphosphat-Hohlpartikel stimmt mit der Wandstärke der Calciumphosphat-Hohlpartikeln aus den vorherigen Kapiteln überein.

Mit der phosphorylierten Aminosäure *O*-Phospho-L-Serin lassen sich also ebenso Hohlpartikel mit einer Größe von 100-200 nm herstellen.

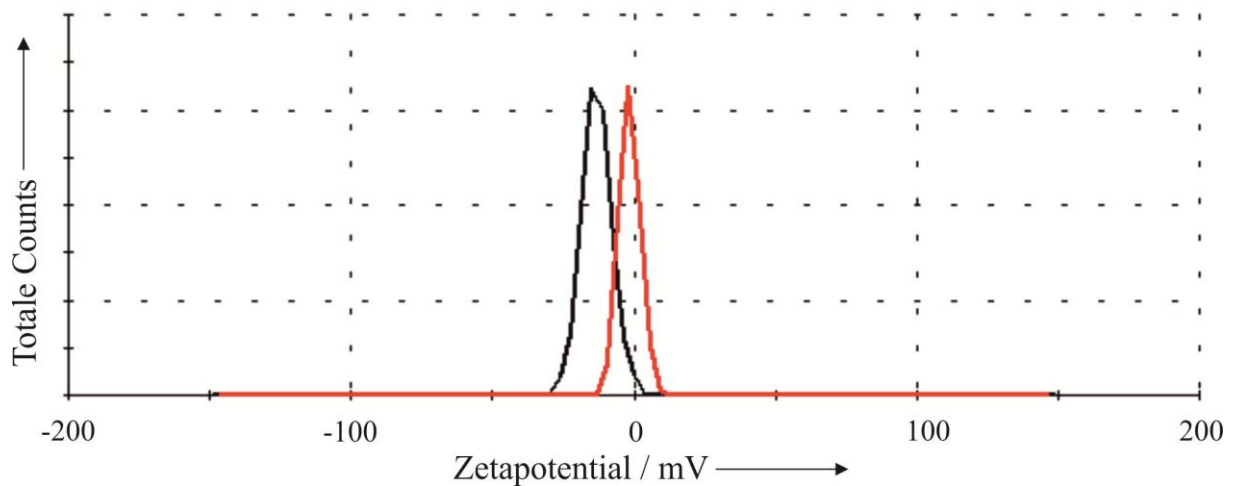
#### 5.1.4 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L-Serin (Ser)

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, wurden die Calciumphosphat-Hohlpartikel in Gegenwart von L-Serin (Ser) hergestellt; die Konzentration von Ser betrug 1,5 mM (1:1) und 0,5 mM (2:1). In **Abbildung 57** ist die Größenverteilung der entstanden Partikel gezeigt.



**Abbildung 57:** Größenverteilung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) L-Serin.

Der hydrodynamische Durchmesser der entstandenen Hohlpartikel beträgt für den Ansatz mit 1,5 mM (1:1) L-Serin 253 nm und für den Ansatz mit 0,5 mM (2:1) L-Serin 489 nm. Neben der Größe bzw. dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel wurden auch hier die Zetapotentiale gemessen. In **Abbildung 58** sind die Ergebnisse der Zetapotentialemessung dargestellt.



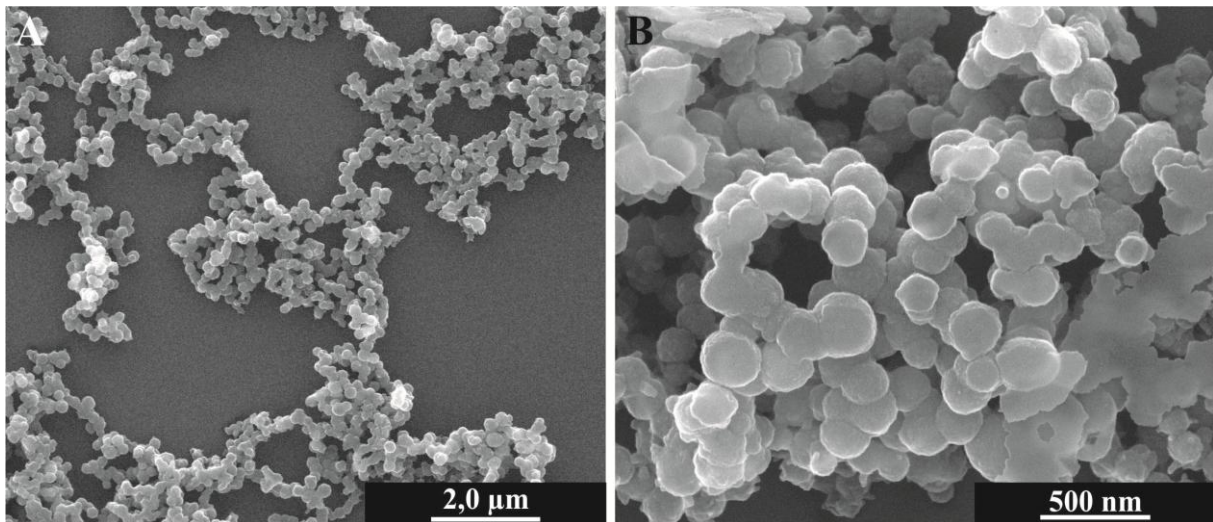
**Abbildung 58:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) (schwarz) und 0,5 mM (2:1) (rot) L-Serin.

Wie in **Abbildung 58** gezeigt, beträgt das Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Serin, -13 mV. Für die Hohlpartikel, erzeugt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) L-Serin, ergibt sich ein Zetapotential von -2 mV. Der Unterschied der Zetapotentiale kann durch die unterschiedlichen Konzentrationen von L-Serin begründet werden. Da das Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1), sehr klein ist, kommt es schnell zur Agglomeration der Partikel; daher ist die gemessene Größenverteilung dieser Partikel auch höher als die der Partikel, die mit 1,5 mM (1:1) L-Serin hergestellt wurden.

Neben der Dynamischen Lichtstreuung wurden an den in Anwesenheit von L-Serin hergestellten Partikeln Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt.

In **Abbildung 59** und **Abbildung 60** sind rasterelektronenmikroskopische Bilder der Hohlpartikel, hergestellt in Anwesenheit von 0,5 mM (2:1) und 1,5 mM (1:1) L-Serin, bei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

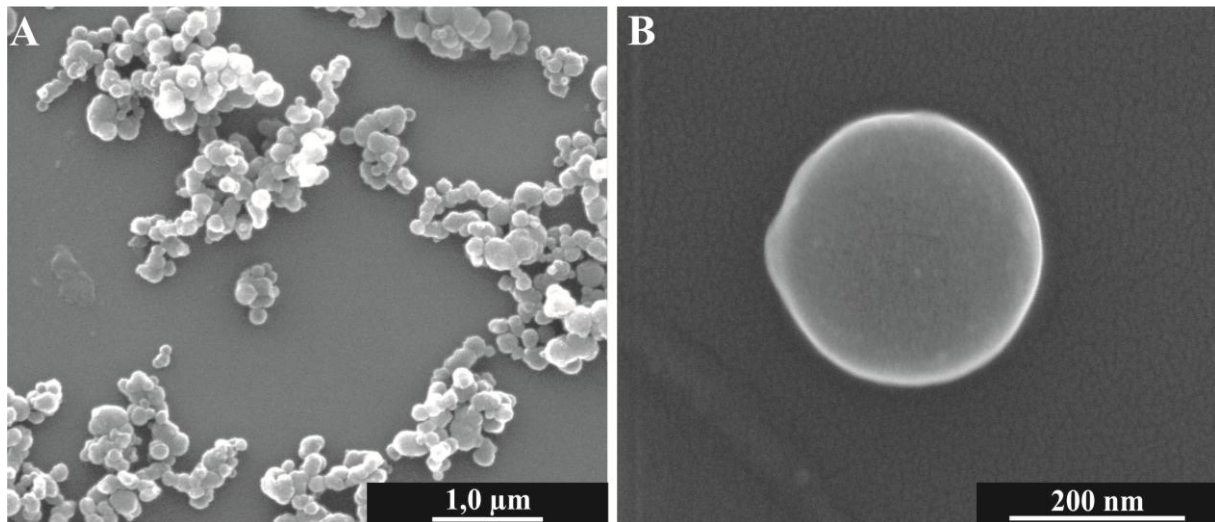




**Abbildung 59:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) L-Serin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

In **Abbildung 59 A** sind Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 0,5 mM (2:1) L-Serin, zu sehen. Die Partikel liegen monodispers vor, es konnten keine aufgebrochenen Partikel beobachtet werden. In **Abbildung 59 B** sind ebenfalls ausschließlich intakte Partikel zu sehen; die Größe der Partikel liegt zwischen 250 und 300 nm. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass die Hohlpartikel aus vielen kleinen primären Calciumphosphat-Nanopartikeln bestehen. Die hier beobachtete kleinere Größe der Partikel im Vergleich zur DLS liegt an der Agglomeration oder Fusion der Partikel in Dispersion aufgrund der geringen elektrostatischen Stabilisierung.

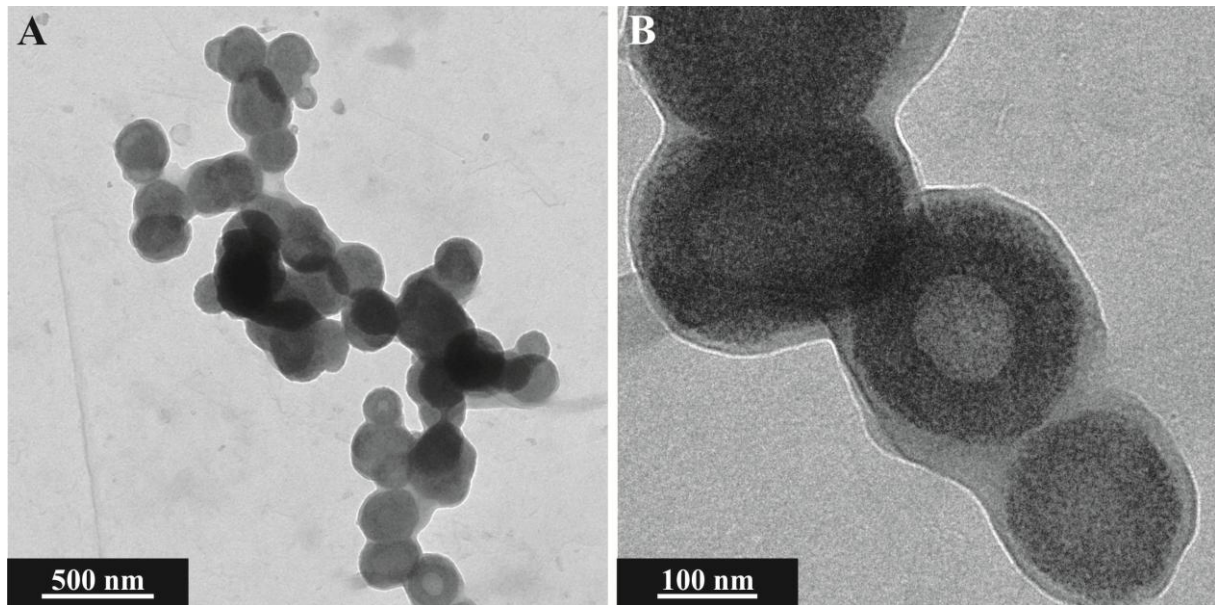
Wie von den mit 0,5 mM (2:1) L-Serin hergestellten Hohlpartikeln, wurden auch von den mit 1,5 mM (1:1) L-Serin hergestellten Hohlpartikeln REM-Bilder angefertigt. Diese Bilder sind in der **Abbildung 60** gezeigt.



**Abbildung 60:** REM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Serin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

In **Abbildung 60 A** ist sichtbar, dass die Partikel monodispers vorliegen. Die Größe der Partikel liegt zwischen 200 nm und 300 nm, was mit den Daten der DLS übereinstimmt. Die **Abbildung 60 B** zeigt ein Calciumphosphat-Partikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Serin. Die Größe des Partikels liegt bei 250 nm. In dieser hohen Vergrößerung wird zudem deutlich, dass die Hohlpartikel aus primären Calciumphosphat-Nanopartikeln entstanden sind.

Von der eingetrockneten Hohlpartikeldispersion wurden auch transmissionselektronenmikroskopische Abbildungen angefertigt. In **Abbildung 61** sind die TEM-Bilder der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Serin, gezeigt.



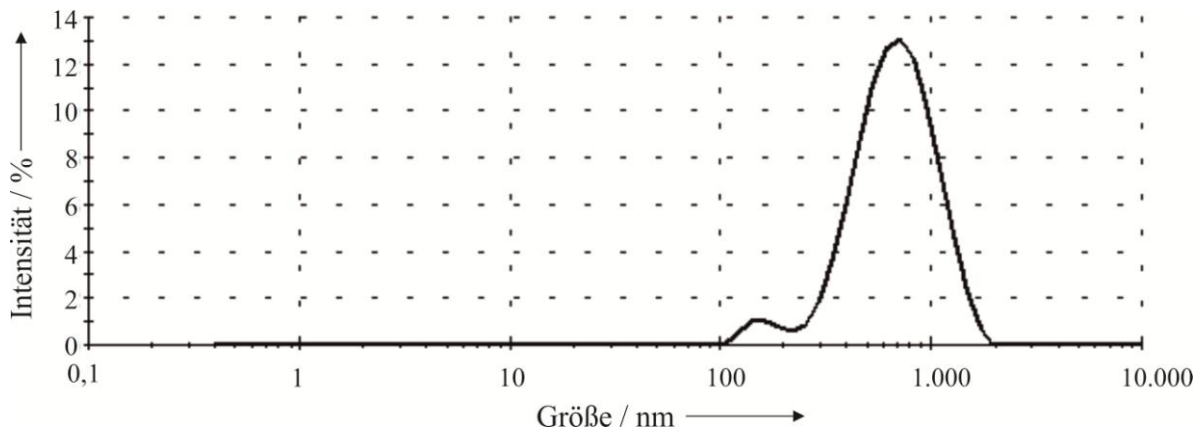
**Abbildung 61:** TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Serin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

Die TEM-Bilder zeigen, dass die mit L-Serin hergestellten Partikel eine Größe zwischen 100 und 200 nm haben. Neben der Größe der Partikel wurde durch die Beobachtung der dunklen Ringstruktur gezeigt, dass die Partikel hohl sind. Die daraus abgeleitete Wandstärke der Hohlpartikel liegt bei 50 nm. Diese Wandstärke ist deutlich stärker als die Wandstärke der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von TyrP, Tyr und Ser.

Neben den Aminosäuren *O*-Phospho-L-Tyrosin, L-Tyrosin und *O*-Phospho-L-Serin lassen sich also ebenfalls mit L-Serin Calciumphosphat-Hohlpartikel mit einer Größe zwischen 100 und 350 nm, je nach eingesetzter Konzentration von L-Serin, herstellen.

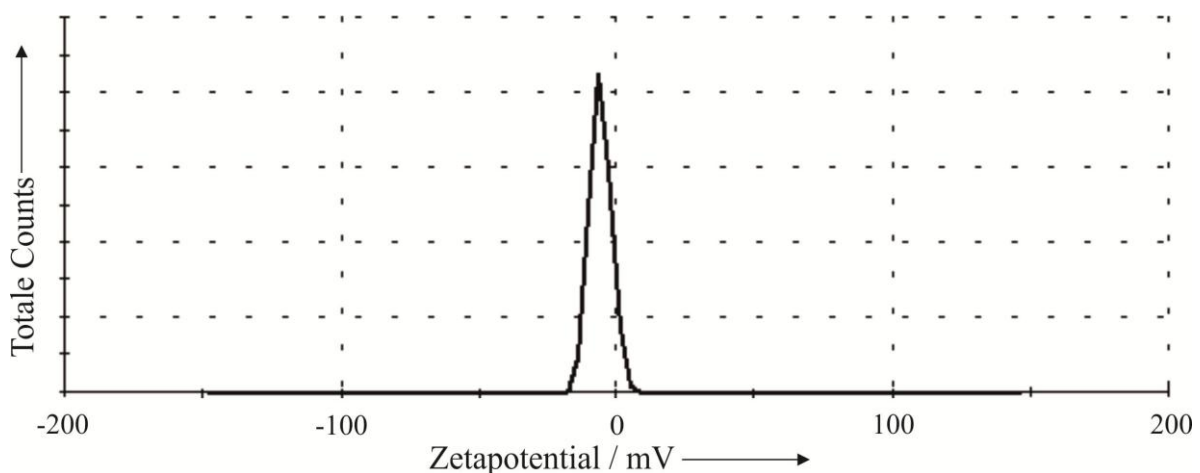
### 5.1.5 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von L-Alanin (Ala)

Die Hohlpartikel aus Calciumphosphat wurden in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin (Ala), wie in Kapitel 4.2 beschrieben, hergestellt. In **Abbildung 62** ist die mittels Dynamischer Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung der entstandenen Partikel gezeigt.



**Abbildung 62:** Größenverteilung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, gemessen mittels DLS, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin.

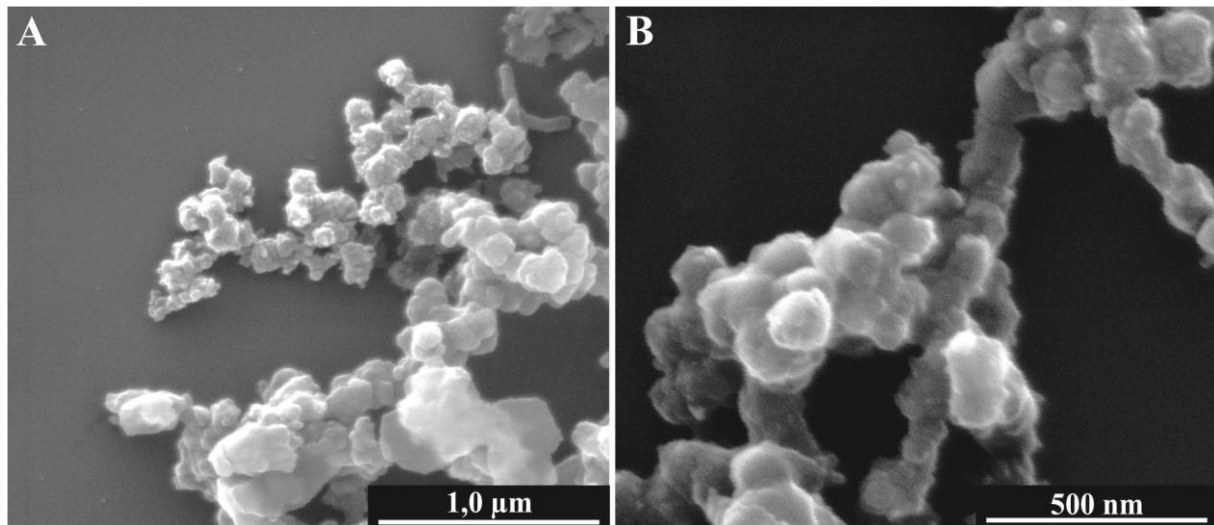
Der hydrodynamische Durchmesser der entstandenen Partikel beträgt für 3 mM L-Alanin 577 nm. Neben der Größe wurde auch das Zetapotential bestimmt. Wie in **Abbildung 63** zu sehen ist, ist das Zetapotential mit -6 mV sehr klein.



**Abbildung 63:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin.

Dieses kleine Zetapotential führt dazu, dass die Hohlpartikel nur kurzzeitig als Dispersion vorliegen und anschließend agglomerieren.

Abgesehen von der Dynamischen Lichtstreuung wurden die Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin, zudem mit der Rasterelektronenmikroskopie analysiert. In **Abbildung 64** sind die Partikel bei zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt.

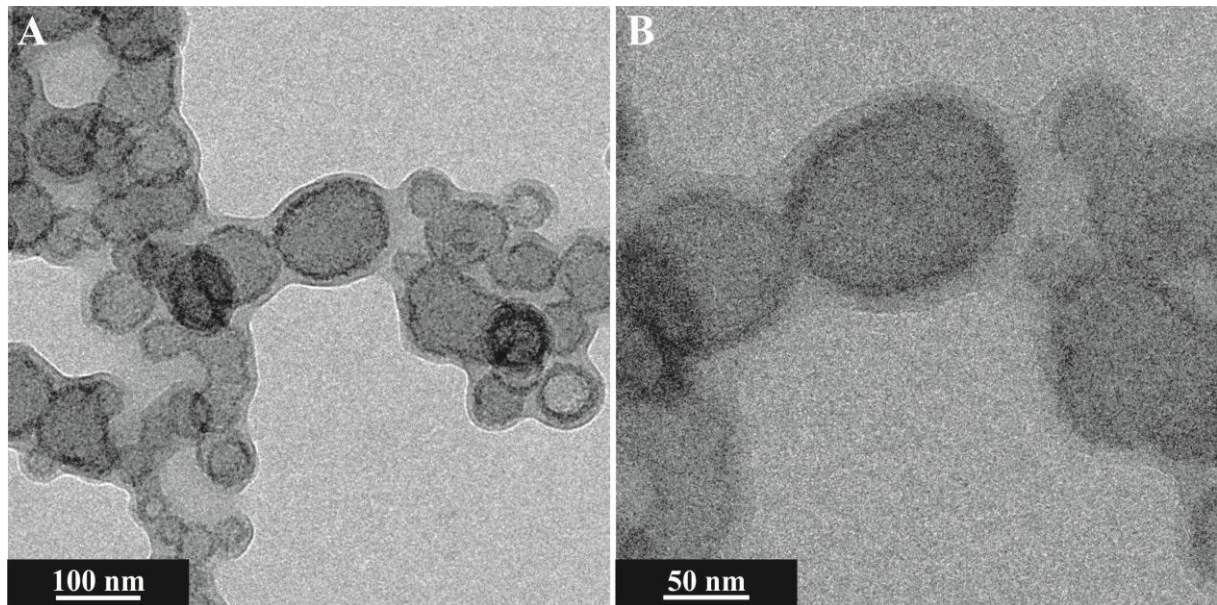


**Abbildung 64:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

Die Partikel weisen eine sphärische Morphologie auf und haben eine Größe von 200 bis 250 nm. Die hier beobachtete kleinere Größe der Partikel, im Gegensatz zur DLS, liegt an der Agglomeration oder Fusion der Partikel in Dispersion aufgrund der geringen elektrostatischen Stabilisierung.

Von den Calciumphosphat-Hohlpartikeln wurden auch transmissionselektronenmikroskopische Abbildungen angefertigt. In **Abbildung 65** sind die TEM-Bilder der eingetrockneten Hohlpartikel gezeigt.





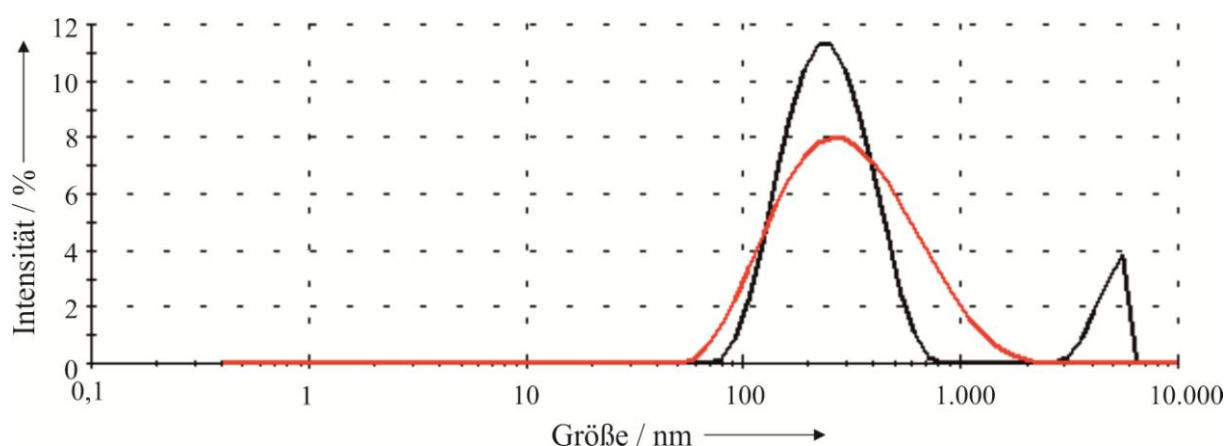
**Abbildung 65:** TEM-Bilder von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) L-Alanin, bei verschiedenen Vergrößerungen.

Die TEM-Bilder zeigen ebenso wie die rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen und die TEM-Bilder der anderen Hohlpartikel, dass die mit L-Alanin hergestellten Partikel eine Größe zwischen 50 und 200 nm haben. Neben der Größe der Partikel konnte durch die beobachtete dunkle Ringstruktur gezeigt werden, dass die entstandenen Partikel hohl sind. Die Wandstärke der Hohlpartikel liegt bei 10 nm; dies stimmt mit der Wandstärke der anderen Hohlpartikel überein.

Auch mit der Aminosäure L-Alanin lassen sich also Hohlpartikel mit einer Größe von 200-500 nm herstellen.

### 5.1.6 Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart der Dipeptide Serin-Tyrosin (Ser-Tyr) und Alanin-Tyrosin (Ala-Tyr)

Neben den verwendeten Aminosäuren wurden auch die zwei Dipeptide Serin-Tyrosin (Ser-Tyr) und Alanin-Tyrosin (Ala-Tyr) verwendet. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, wurden die Calciumphosphat-Hohlpartikel in Gegenwart der verwendeten Dipeptide hergestellt. Die Konzentration der Dipeptide betrug 1,5 mM (1:1) und 0,5 mM (2:1). In **Abbildung 66** ist die Größenverteilung der entstandenen Partikel, gemessen mit der Dynamischen Lichtstreuung, gezeigt. Die schwarze Kurve zeigt die Größenverteilung von Partikeln, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) Ser-Tyr; die rote Kurve stellt die Größenverteilung von Partikeln, erzeugt in Anwesenheit von 1,5 mM (1:1) Ala-Tyr, dar.

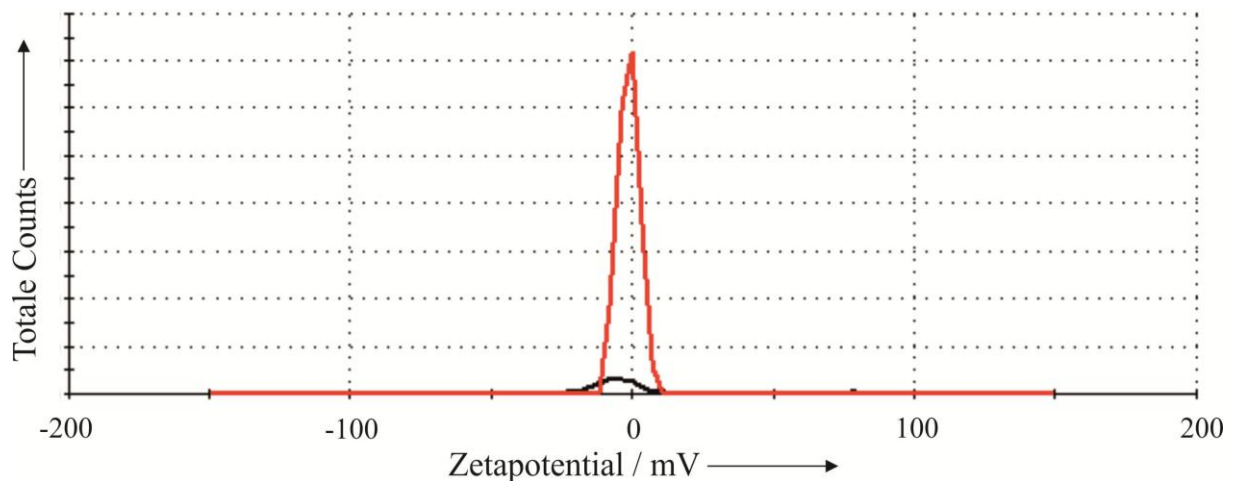


**Abbildung 66:** Größenverteilung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, gemessen mittels DLS, hergestellt in Gegenwart der 1,5 mM (1:1) Dipeptide Ser-Tyr (schwarz) und Ala-Tyr (rot).

Der hydrodynamische Durchmesser der entstandenen Partikel beträgt für den Ansatz mit 1,5 mM (1:1) Ser-Tyr 270 nm und für den Ansatz mit 1,5 mM (1:1) Ala-Tyr 240 nm. Für die Ansätze mit 1,5 mM der Dipeptide ergeben sich hydrodynamische Durchmesser der Partikel von 260 nm für Ser-Tyr und 230 nm für Ala-Tyr .

Neben der Größe bzw. dem hydrodynamischen Durchmesser der Partikel

wurden auch die Zetapotentiale bestimmt. In **Abbildung 67** sind die Messwerte der Zetapotentialmessung dargestellt. Die schwarze Kurve zeigt das Zetapotential von Partikeln, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) Ser-Tyr, und die rote Kurve stellt das Zetapotential von Partikeln, erzeugt in Anwesenheit von 1,5 mM (1:1) Ala-Tyr, dar.



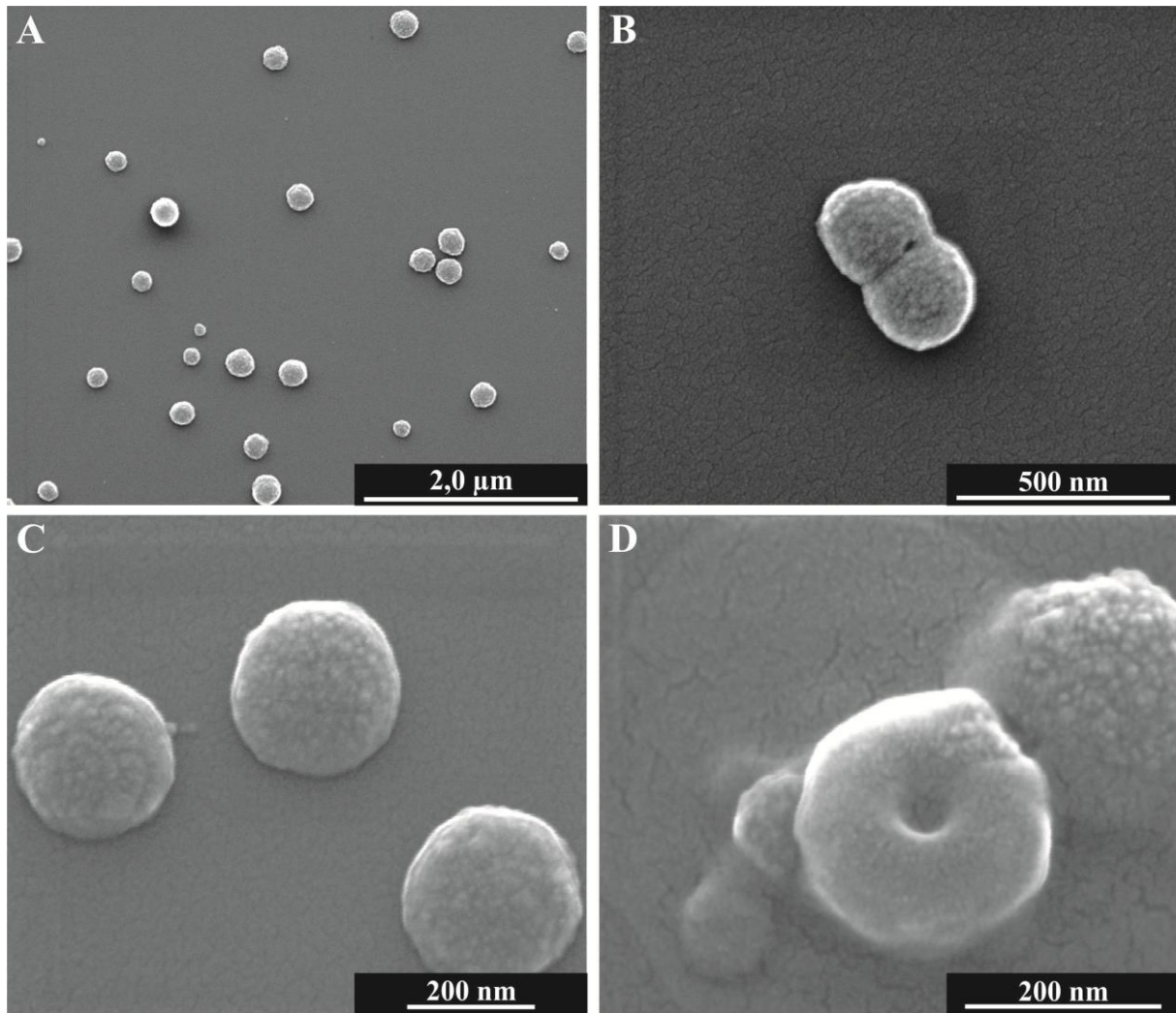
**Abbildung 67:** Zetapotential von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart der 1,5 mM (1:1) Dipeptide Ser-Tyr (schwarz) und Ala-Tyr (rot).

Wie in **Abbildung 67** gezeigt, beträgt das Zetapotential der Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) Ser-Tyr, -2 mV. Für die Hohlpartikel, gebildet in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) Ala-Tyr, ergibt sich ein Zetapotential von -1 mV. Für die Ansätze mit 0,5 mM (2:1) der Dipeptide ergeben sich Zetapotentiale der Partikel von -5 mV für Ser-Tyr und -10 mV für Ala-Tyr.

Neben der Dynamischen Lichtstreuung und Zetapotentialmessung wurden rasterelektronenmikroskopische Abbildungen der entstandenen Partikel erstellt, die in **Abbildung 68** und **Abbildung 69** gezeigt sind.

**Abbildung 68 A** zeigt ein Übersichtsbild der mit 1,5 mM (1:1) Ser-Tyr entstandenen Partikel. Die entstandenen sphärischen Partikel liegen monodispers mit einer Größe von 200-250 nm vor, was sehr gut mit den Daten der Dynamischen Lichtstreuung übereinstimmt.

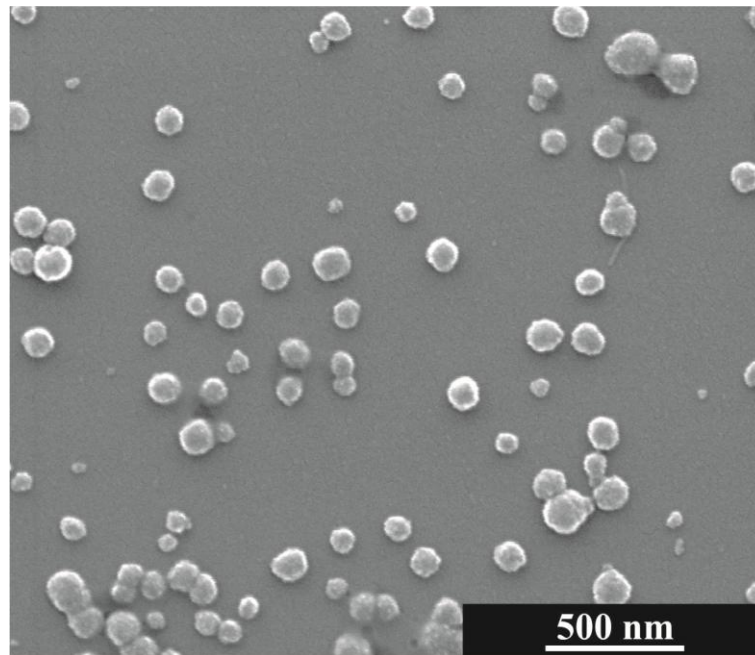




**Abbildung 68:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart des 1,5 mM (1:1) Dipeptids Ser-Tyr bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

In der **Abbildung 68 B** ist die Fusion von zwei einzelnen Calciumphosphat-Hohlpartikeln zu einem Partikel zu sehen. An der Fusionsstelle ist zudem ein kleines Loch im Partikel sichtbar, was auf den hohlen Charakter der Partikel schließen lässt. Das in **Abbildung 68 D** gezeigte Partikel bestätigt diesen hohlen Charakter, da auch hier ein Loch im Partikel zu sehen ist. Bei den in **Abbildung 68 C** gezeigten Partikeln ist zu erkennen, dass diese Partikel wie die in Gegenwart von Aminosäuren hergestellten Partikel auch aus 10 nm großen primären Calciumphosphat-Nanopartikeln bestehen.

Die **Abbildung 69** zeigt ein Übersichtsbild von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, die mit 1,5 mM (1:1) des Dipeptides Alanin-Tyrosin hergestellt wurden. Die entstandenen Partikel sind ebenfalls sphärisch und liegen monodispers mit einer Größe von 150 bis 200 nm vor. Die Größe stimmt mit den Daten, die mit der Dynamischen Lichtstreuung beobachtet wurden, überein. Es wurden keine aufgebrochenen Partikel oder Partikel mit Löchern beobachtet.

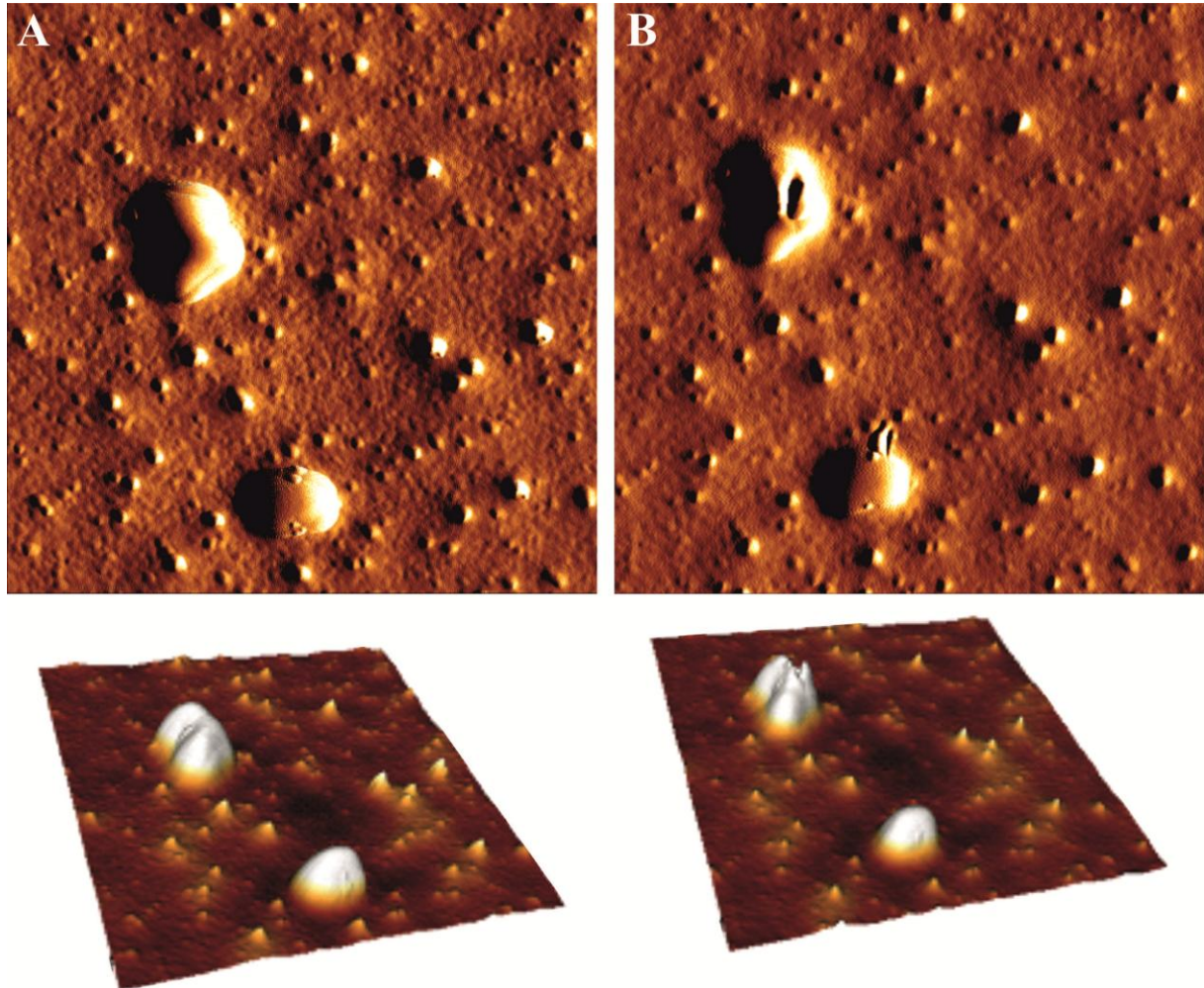


**Abbildung 69:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart des 1,5 mM (1:1) Dipeptids Ala-Tyr.

Um zu überprüfen, ob die entstandenen Partikel tatsächlich hohl sind, wurden rasterkraftmikroskopische Abbildungen mit *Nanoindentation* angefertigt. In **Abbildung 70** sowie in **Abbildung 71** sind Bilder der Rasterkraftmikroskopie von Partikeln, hergestellt mit den Dipeptiden Ser-Tyr und Ala-Tyr, vor und nach der *Nanoindentation* gezeigt.

In **Abbildung 70 A** ist ein mit 1,5 mM (1:1) Dipeptid Serin-Tyrosin hergestelltes Calciumphosphat-Hohlpartikel vor dem Eindrückversuch zu sehen.

Der Partikeldurchmesser liegt wie bei den rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen um die 200 nm. Neben der zweidimensionalen Darstellung ist auch eine dreidimensionale Darstellung des Partikels gezeigt.



**Abbildung 70:** Rasterkraftmikroskopische Abbildung mit 3D-Darstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart des 1,5 mM (1:1) Dipeptids Ser-Tyr. A) vor dem Eindrückversuch und B) nach dem Eindrückversuch.

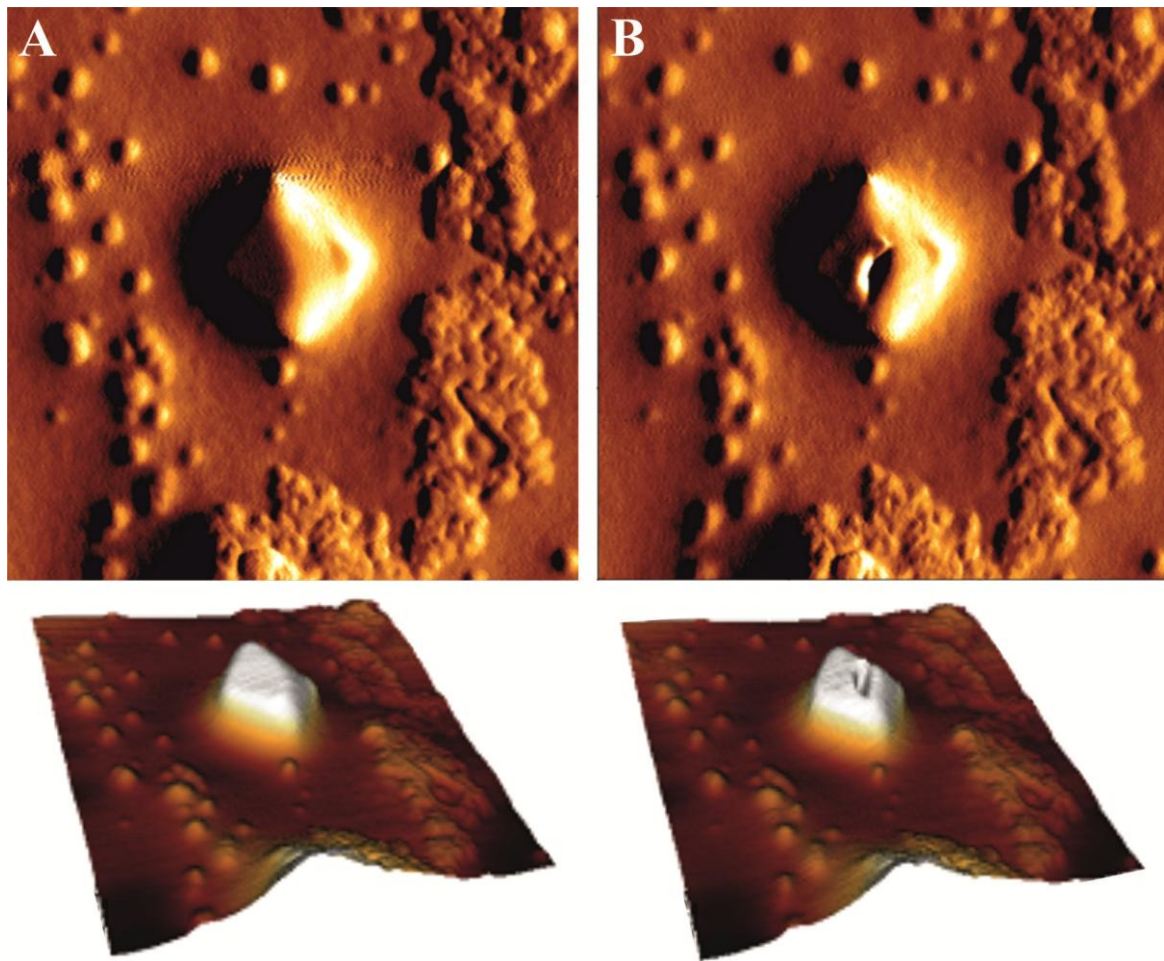
**Abbildung 70 B** zeigt dasselbe Partikel nach dem Eindrückversuch. Hier ist sowohl im 2D- als auch im 3D-AFM-Bild die Eindrückstelle deutlich zu sehen; eine Größenänderung ist nicht zu beobachten.

In **Abbildung 71 A** ist ein mit 1,5 mM (1:1) Dipeptid Alanin-Tyrosin hergestelltes Calciumphosphat-Hohlpartikel vor dem Eindrückversuch zu sehen. Der Partikeldurchmesser liegt wie bei den rasterelektronenmikroskopischen Ab-

---



bildungen um die 200 nm. Auch hier ist eine zweidimensionale sowie eine dreidimensionale Darstellung des Partikels gezeigt.



**Abbildung 71:** Rasterkraftmikroskopische Abbildung mit 3D-Darstellung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln, hergestellt in Gegenwart des 1,5 mM (1:1) Dipeptids Ala-Tyr. A) vor dem Eindrückversuch und B) nach dem Eindrückversuch.

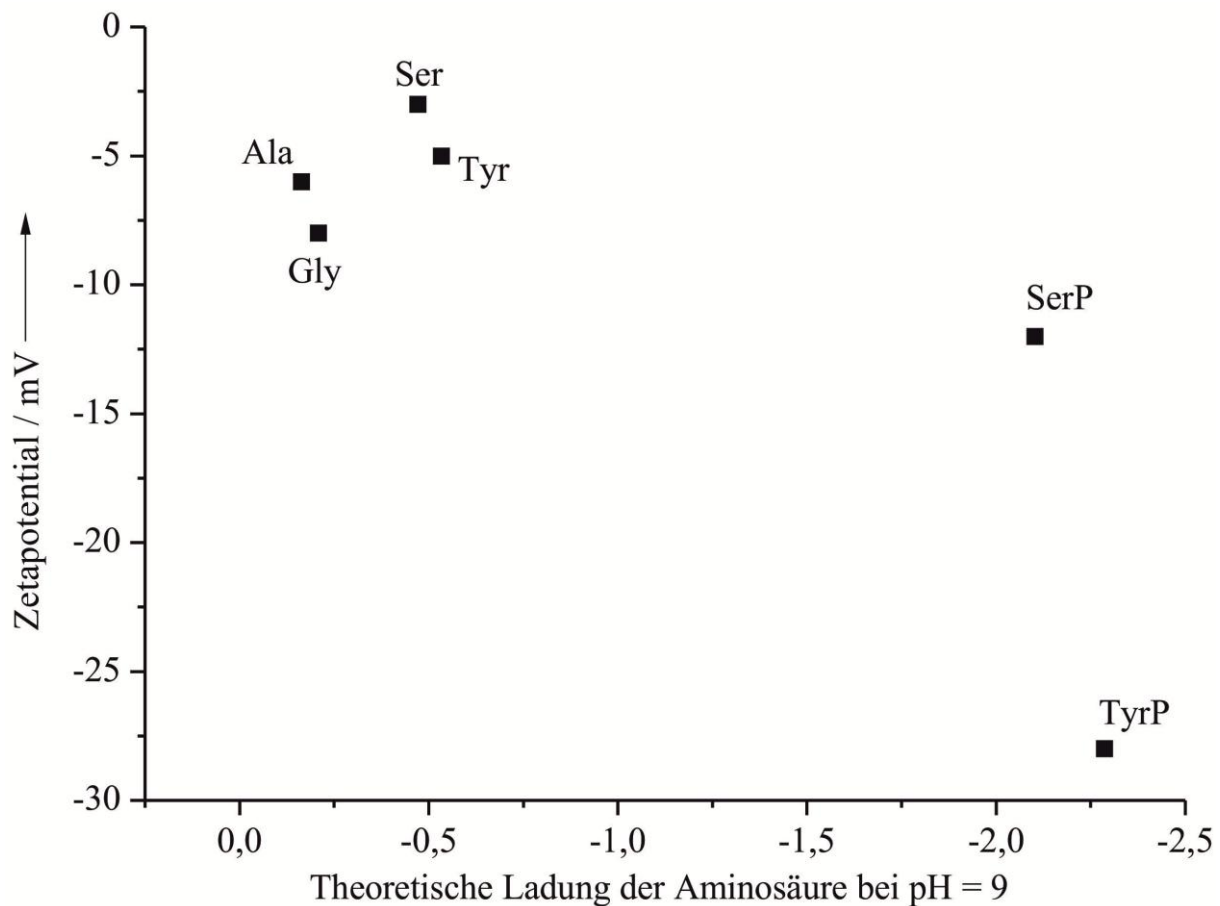
**Abbildung 71 B** zeigt dasselbe Partikel nach dem Eindrückversuch. Hier ist sowohl im 2D- als auch im 3D-AFM-Bild die Eindrückstelle deutlich zu sehen; eine Größenänderung ist nicht zu beobachten.

Mittels Dynamischer Lichtstreuung, Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich auch mit den verwendeten Dipeptiden Calciumphosphat-Hohlpartikel mit einem Durchmesser um die 200 nm herstellen lassen.

### **5.1.7 Zusammenfassung des Kapitels: Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von Aminosäuren und Dipeptiden**

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich in Gegenwart von Aminosäuren und Dipeptiden Calciumphosphat-Hohlpartikel mit einer Größe von 200 bis 500 nm herstellen lassen. Die Größe der entstehenden Partikel ist von der verwendeten Aminosäure bzw. dem verwendeten Dipeptid abhängig. Durch die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie, die Transmissionselektronenmikroskopie, die Rasterelektronenmikroskopie sowie die Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich um sphärische, hohle Partikel handelt, die aus kleinen Calciumphosphat-Nanopartikeln bestehen. Die in Dispersion stabilsten Partikel lassen sich mit der phosphorylierten Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin herstellen. Diese Partikel sind für 5 min gegen eine Temperatur von 70 °C stabil, sowie 25 min gegen Ultraschall stabil. Die Calciumphosphat-Hohlpartikel sind gegen das Absenken des pH-Wertes nicht stabil, da sie aufgelöst werden. In **Tabelle 10** sind die wichtigsten Daten zusammengefasst dargestellt.

In **Abbildung 72** ist der Vergleich zwischen der berechneten theoretischen Ladung der verwendeten Aminosäuren bei einem pH-Wert von 9 und dem Zetapotential der Hohlpartikel gezeigt. Die Berechnung der Ladung wurde von DA PIEDADE unter Verwendung der  $pK_s$ -Werte der Aminosäuren aus der Literatur durchgeführt.<sup>[63, 85, 90, 113]</sup> Es ist ein Zusammenhang zwischen der berechneten Ladung der verwendeten Aminosäuren bei einem pH-Wert von 9 und dem Zetapotential der entstandenen Hohlpartikel zu beobachten. Aus dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass das Zetapotential der Calciumphosphat-Hohlpartikel in direktem Zusammenhang mit der verwendeten Aminosäure steht, da die berechnete theoretische Ladung mit dem gemessenen Zetapotential korreliert.



**Abbildung 72:** Vergleich zwischen der theoretischen Ladung der Aminosäuren und dem Zetapotential der Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von Aminosäuren

Die in der Literatur beschriebenen Calciumphosphat-Hohlpartikel werden in Gegenwart von Polymeren oder anderen *soft-templates* hergestellt.<sup>[53, 56, 114-117]</sup> So haben z.B. Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von PMMA, eine Größe von 50 nm und eine Wanddicke von 7-31 nm.<sup>[56]</sup> Es wurden auch Calciumphosphat-Hohlpartikel mit Liposomen hergestellt; die Größe dieser Partikel liegt um die 140 nm. Die Wanddicke liegt zwischen 10-40 nm. Die Liposome haben negativ geladene Gruppen an ihrer Oberfläche, die in Wechselwirkung mit dem Calciumphosphat treten.<sup>[115]</sup> Diese Literaturdaten stimmen mit den in diesem Kapitel gezeigten Calciumphosphat-Hohlpartikeln überein.

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Calciumphosphat-Hohlpartikel, hergestellt in Gegenwart von Aminosäuren oder Dipeptiden.

<b>Aminosäure oder Dipeptid</b>	<b>Vol.- Ver- hältnis CaP:AS</b>	<b>End- konzentration / mM</b>	<b>Größe / nm (DLS)</b>	<b>Wand- stärke /nm</b>	<b>Zeta- potential / mV</b>	<b>Morphologie (gezeigt durch)</b>
<i>O</i> -Phospho- L-Tyrosin (TyrP)	1:1 2:1	1,5 0,5	270 360	10 -	-23 -16	sphärisch, hohl (REM, TEM, AFM)
L-Tyrosin (Tyr)	1:1 2:1	1,5 0,5	580 542	10 -	-6 -3	sphärisch, hohl (TEM, AFM)
<i>O</i> -Phospho- L-Serin (SerP)	1:1 2:1	1,5 0,5	530 440	10 -	-12 -8	sphärisch, hohl (TEM)
L-Serin (Ser)	1:1 2:1	1,5 0,5	250 489	10 -	-13 -2	sphärisch, hohl (TEM)
L-Alanin (Ala)	1:1	1,5	580	10	-6	sphärisch, hohl (TEM)
Serin-Tyrosin (Ser-Tyr)	1:1 2:1	1,5 0,5	270 260	- -	-1 -5	sphärisch, hohl (REM, AFM)
Alanin- Tyrosin (Ala-Tyr)	1:1 2:1	1,5 0,5	240 230	- -	-1 -10	sphärisch, hohl (AFM)

## **5.2 Aminosäuren in Wasser**

Um die Bildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel zu erklären, wurde auch das Verhalten von reinen Aminosäuren in Wasser untersucht. Dazu wurden die Aminosäure-Lösungen hauptsächlich mittels NTA untersucht; des Weiteren fanden auch die Rasterkraftmikroskopie sowie die Massenspektroskopie Anwendung. Um zu sehen, welche funktionellen Gruppen der Aminosäuren eine Rolle bei der Bildung der Hohlpartikel spielen, wurden auch Harnstoff, Natriumacetat, *para*-Aminosalicylsäure (PAS) und eine Boc-geschützte Aminosäure verwendet.

### **5.2.1 Aminosäuren**

Für die Untersuchung des Verhaltens von Aminosäuren in Wasser wurden verschiedenen Aminosäuren verwendet und mittels *Nanoparticle Tracking Analysis* die Größe und Partikelkonzentration der Aminosäurevesikel bestimmt. Weiter wurde auch derjenige pH-Wert bestimmt, ab dem sich die Aminosäurevesikel für die jeweilige Aminosäure bildeten; dazu wurde der pH-Wert schrittweise mittels NaOH erhöht, bis erste Partikel beobachtet wurden. Die Partikeldurchmesser lagen zwischen 91 und 155 nm. In **Tabelle 11** sind der pH-Wert, ab dem Aminosäurevesikel zu beobachten waren, der Partikeldurchmesser der Vesikel und die Partikelkonzentration (Vesikelkonzentration) für die verwendeten Aminosäuren Glycin (Gly), L-Alanin (Ala), L-Serin (Ser), *O*-Phospho-L-Serin (SerP), L-Tyrosin (Tyr) und *O*-Phospho-L-Tyrosin (TyrP) angegeben.

Dieselben Untersuchungen wie für die Aminosäuren wurden ebenfalls für die zwei Dipeptide Alanin-Tyrosin (Ala-Tyr) und Serin-Tyrosin (Ser-Tyr) durchgeführt. Die Analysedaten der Dipeptide sind ebenfalls in **Tabelle 11** aufgeführt. Um eine Verunreinigung des Wasser auszuschließen, wurde ein Blindwert für Wasser bestimmt. Ein Partikeldurchmesser konnte nicht bestimmt werden, und die Partikelkonzentration lag bei  $0,06 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ .



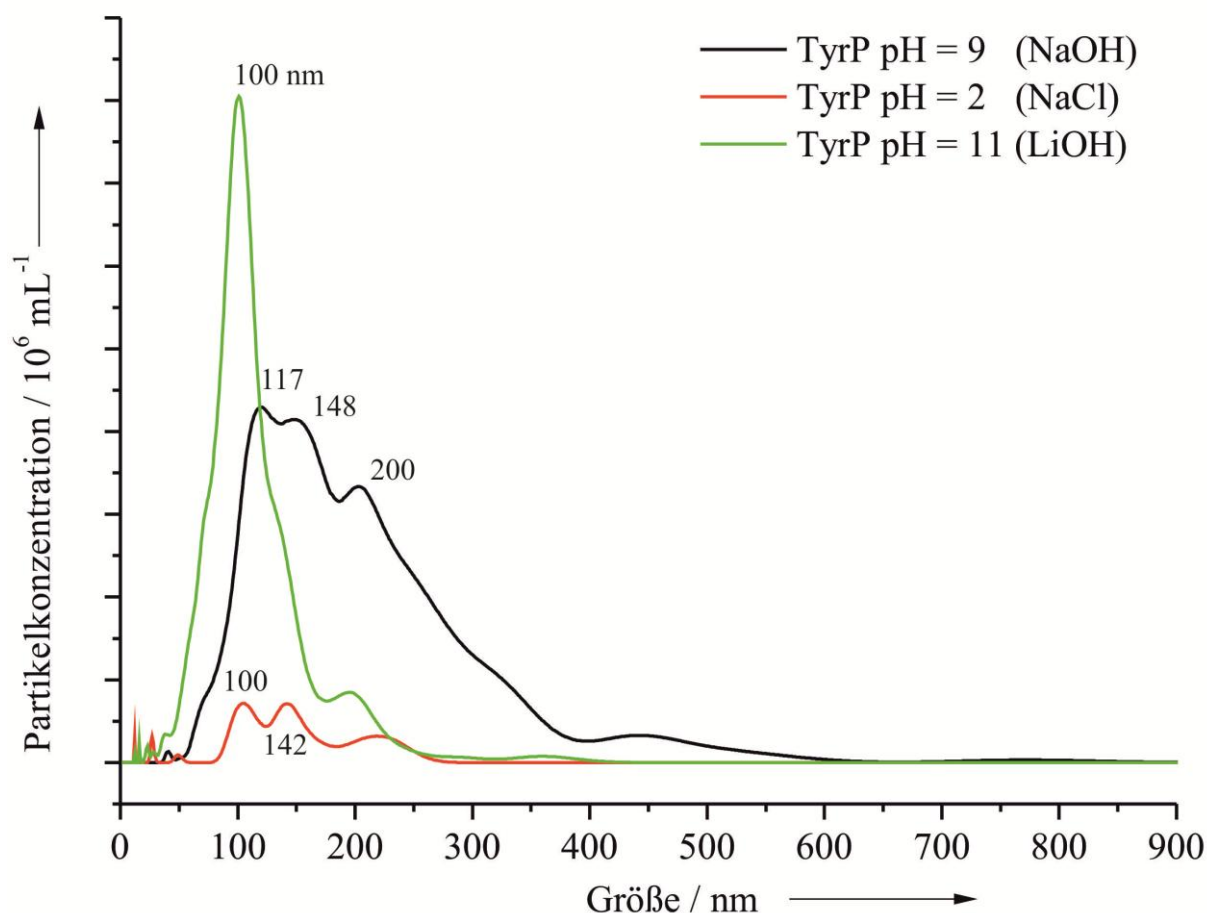
**Tabelle 11:** Beobachtete Aminosäurevesikel mittels NTA.

Aminosäure / Dipeptid	pH-Wert	Partikeldurchmesser / nm	Partikelkonzentration / $10^8 \text{ mL}^{-1}$
Glycin	9,1	146	0,99
L-Alanin	9,0	139	0,43
L-Serin	6,3	91	1,01
<i>O</i> -Phospho- L-Serin	9,0	112	1,21
L-Tyrosin	9,1	99	0,61
<i>O</i> -Phospho- L-Tyrosin	9,0	155	3,86
Alanin- Tyrosin	7,3	146	0,51
Serin- Tyrosin	9,2	148	0,46

Die unterschiedlichen Partikelkonzentrationen der Aminosäuren und Dipeptide in **Tabelle 11** sind sehr auffällig. Es konnten teilweise nur ca. 10 Vesikel pro Bild beobachtet werden, was aber dennoch deutlich über dem Blindwert von Wasser lag. Durch diese geringe Anzahl der beobachteten Vesikel ist eine Reproduzierbarkeit der Vesikelkonzentrationen schwer möglich. Der Fehler der Größenmessung liegt bei ca.  $\pm 50 \text{ nm}$  und der Fehler der Konzentration beträgt ca.  $\pm 10 \%$ .

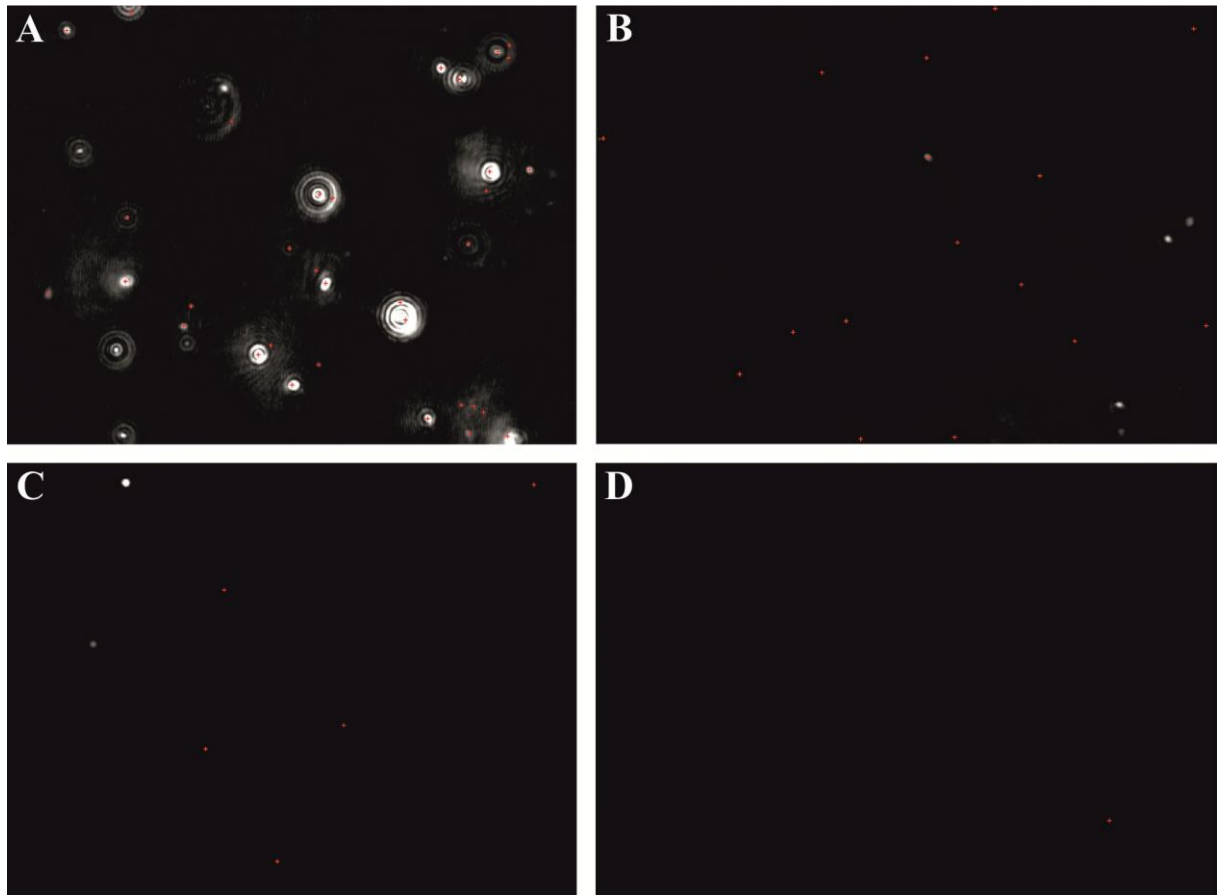
Um zu sehen, inwieweit die Natriumionen eine Rolle bei der Bildung der Aminosäurevesikel spielen, wurde eine  $3 \text{ mM}$  *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung auf einen pH-Wert von 9 mit NaOH eingestellt. Die Partikelkonzentration lag hier bei  $3,86 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  und der Vesikeldurchmesser bei  $155 \text{ nm}$ . In einem weiteren

Versuch wurden der TyrP-Lösung bei einem pH-Wert von 2 Natriumionen in Form von NaCl hinzugefügt. Dabei war die Partikelkonzentration mit  $0,34 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  deutlich niedriger. Des Weiteren wurde der pH-Wert einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung zusätzlich mit LiOH auf 11 eingestellt, da Lithiumionen einen größeren Clusterungseffekt haben als Natriumionen. Der Durchmesser der beobachteten Vesikel lag um die 100 nm und die beobachtete Partikelkonzentration lag bei  $2,42 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . In **Abbildung 73** sind die Daten der NTA-Analyse grafisch dargestellt. Neben NaOH und LiOH wurde auch  $\text{NH}_3$ -Lösung zum Einstellen des pH-Wertes einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung auf pH = 9 verwendet, auch hier waren deutlich Vesikel zu beobachten.



**Abbildung 73:** Nanoparticle Tracking Analysis-Daten von *O*-Phospho-L-Tyrosin bei verschiedenen pH-Werten.

In **Abbildung 74** ist ein Vergleich des mittels NTA beobachteten Streulichtes der Aminosäurevesikel dargestellt. Die Unterschiede des Streulichtes zwischen TyrP mit NaOH (**A**), LiOH (**B**) und NaCl (**C**) sind erkennbar. In **Abbildung 74 D** ist zum Vergleich das Streulichtbild von Reinstwasser gezeigt.

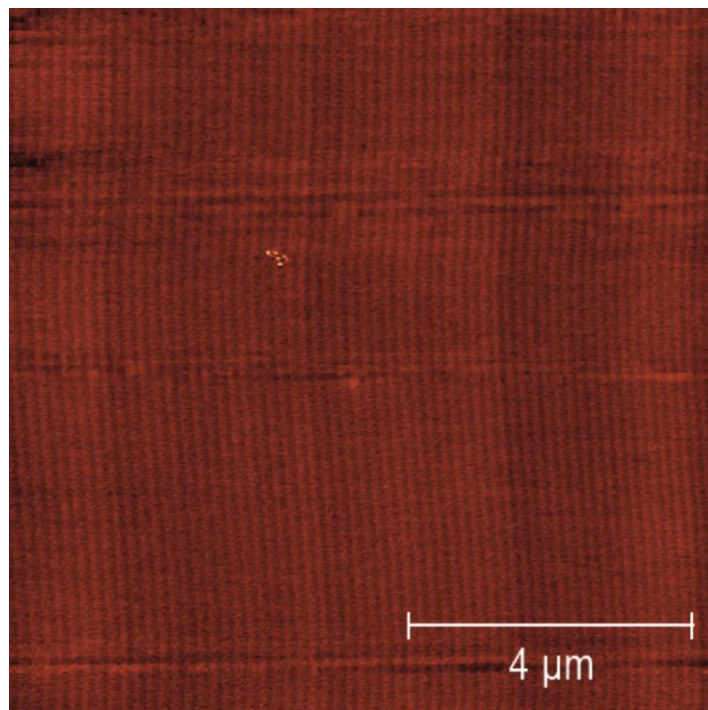


**Abbildung 74:** Mittels NTA beobachtetes Streulicht von A) *O*-Phospho-L-Tyrosin (pH = 9 mittels NaOH), B) *O*-Phospho-L-Tyrosin (pH = 11 mittels LiOH) C) *O*-Phospho-L-Tyrosin (pH = 2 plus NaCl) und D) reinem Wasser als Blindwert.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert ausschlaggebend für die Vesikelbildung ist und die Kationen keine bzw. lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Selbst bei der Verwendung von  $\text{NH}_3$ -Lösung konnten Vesikel beobachtet werden. Bei der Zugabe von NaCl zu einer 3 mM TyrP-Lösung wurden nur Vesikel im Konzentrationsbereich des Blindwertes beobachtet, das heißt es haben sich effektiv keine Vesikel gebildet.

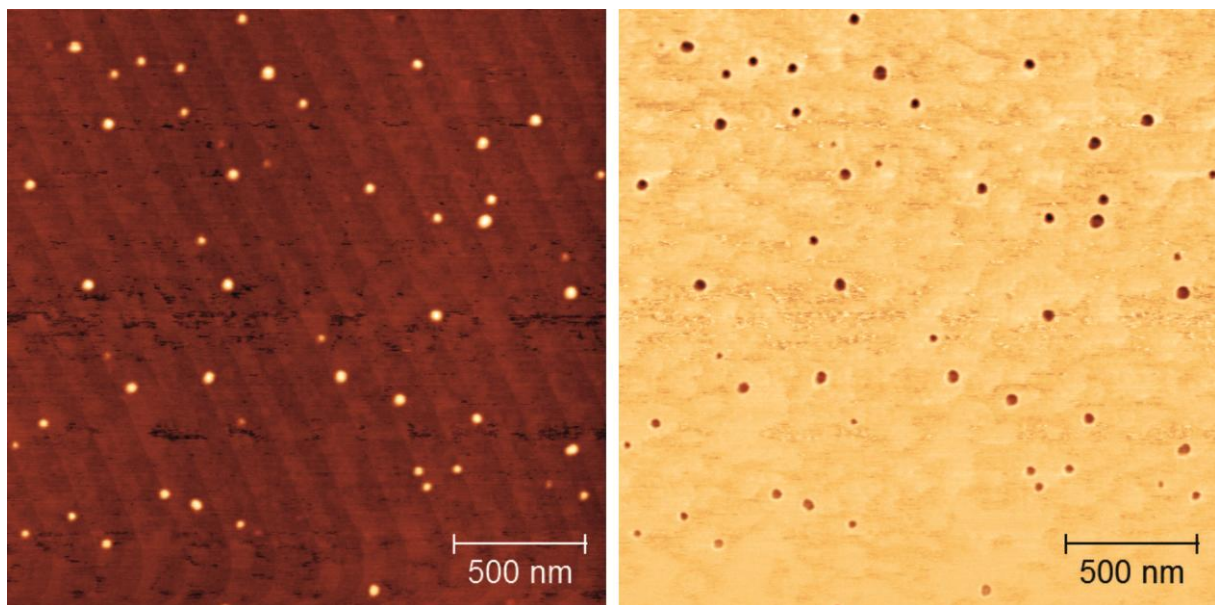
Eine weitere Methode zum Nachweis der Aminosäurevesikel ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM) in Verbindung mit den dabei entstehenden Phasenbildern. Die Proben wurden, wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben, mittels *Spincoating* auf einen Glimmer-Probenträger präpariert. Diese Methode ist ein gängiges Verfahren zum Nachweis von verschiedensten Vesikeln.<sup>[118-120]</sup> Das Phasenbild von Vesikeln unterscheidet sich deutlich von dem eines massiven Partikels, da es aufgrund der Materialeigenschaften zu unterschiedlichen Wechselwirkungen und Schwingungen des *Cantilevers* kommt.<sup>[63, 105, 106, 121]</sup> Das Phasenbild von Vesikeln zeigt eine Art „Leuchten“, während das von massiven Partikeln konstant nur Farbe zeigt.<sup>[61]</sup>

In **Abbildung 75** ist ein AFM-Bild einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Probe bei einem pH-Wert von 2,5 gezeigt. Wie auf diesem Bild sehr gut zu erkennen ist, sind keine Vesikel sichtbar, d.h. dass sich bei diesem pH-Wert noch keine Aminosäurevesikel gebildet haben.

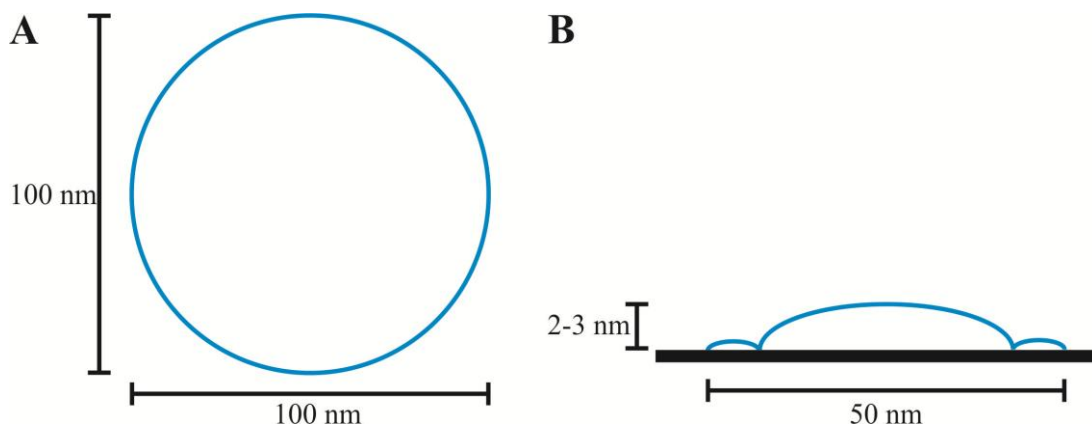


**Abbildung 75:** AFM-Bild einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung (pH = 2,5) nach dem *Spincoating*.

Werden nun zum Vergleich das AFM-Bild sowie das Phasenbild von *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 9, eingestellt mit NaOH, betrachtet, so sind sehr deutlich Aminosäurevesikel zu erkennen. Anhand des Phasenbilds lässt sich sagen, dass es sich um Vesikel und nicht um massive Partikel handelt. Die in **Abbildung 76** dargestellten *O*-Phospho-L-Tyrosin-Vesikel haben eine Höhe von bis zu 3 nm und einen Durchmesser um die 50 nm. Die geringe Höhe der Vesikel ist darauf zurückzuführen, dass die Vesikel beim Eintrocknen kollabieren und nicht ihre sphärische Form behalten, wie in **Abbildung 77** gezeigt.



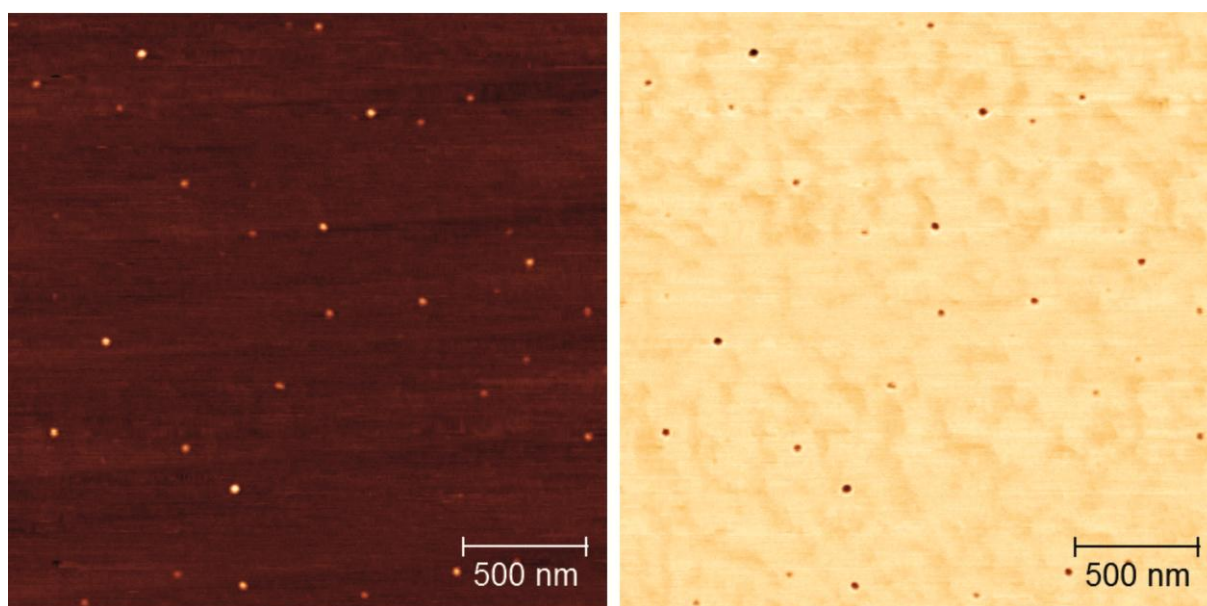
**Abbildung 76:** AFM-Bild und Phasenbild nach dem *Spincoating* von 3mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei pH = 9, eingestellt mit NaOH.



**Abbildung 77:** Schematische Darstellung der Vesikel-Eintrocknung A) vor dem Trocknen und B) nach dem Trocknen.



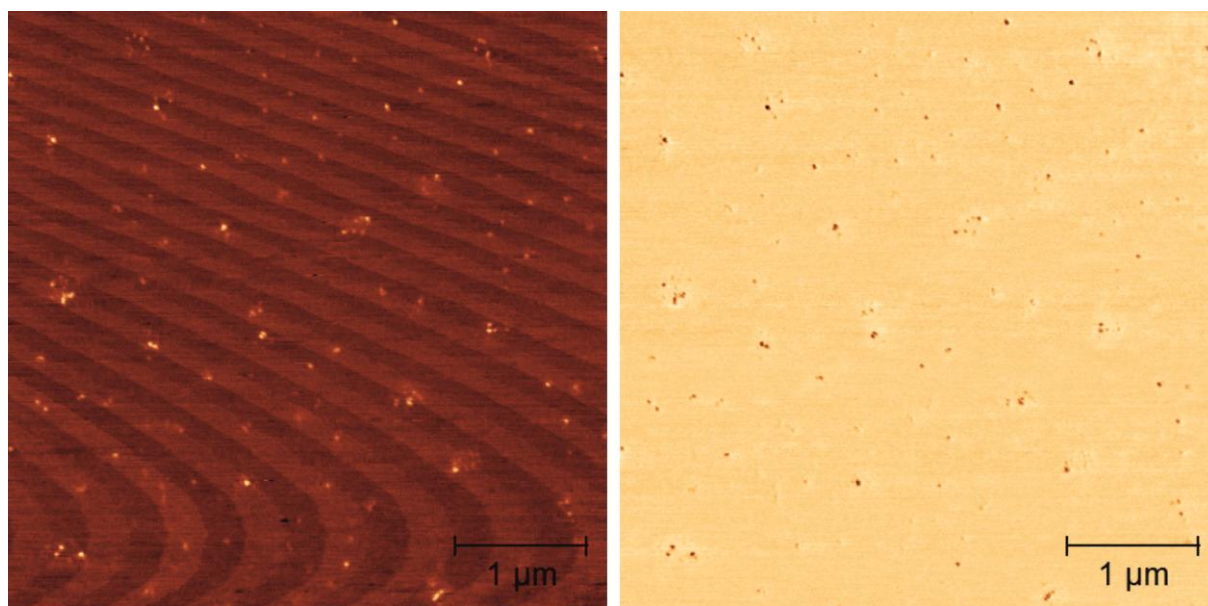
Um die rasterkraftmikroskopischen Daten mit der NTA zu vergleichen, wurden hier ebenfalls Lithiumhydroxid und Natriumchlorid verwendet. Das in **Abbildung 78** gezeigt AFM- und Phasenbild zeigt Vesikel, bestehend aus *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 11, eingestellt mit LiOH. Die Vesikel haben auch hier einen Durchmesser um die 50 nm und eine Höhe von ca. 3 nm. Das Phasenbild zeigt hier analog, dass es sich um Vesikel und nicht um massive Partikel handelt.



**Abbildung 78:** AFM-Bild und Phasenbild nach dem *Spincoating* von 3mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei pH = 11, eingestellt mit LiOH.

In dem in **Abbildung 79** gezeigten AFM-Bild sind zwar auch Partikel zu sehen, anhand des Phasenbildes wird jedoch gezeigt, dass es sich um massive Partikel handelt. Dieser Unterschied erklärt sich dadurch, dass es sich bei Vesikeln nicht um massive Partikel, sondern, wie in **Abbildung 77** gezeigt, um ein „weiches“ Material handelt. Diese Partikel stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit von dem eingetrockneten Natriumchlorid und nicht von der Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin, da das AFM von TyrP (**Abbildung 75**) keine Partikel zeigt. Der pH-

Wert von *O*-Phospho-L-Tyrosin wurde hier nicht eingestellt und lag wie in **Abbildung 75** bei 2,5.



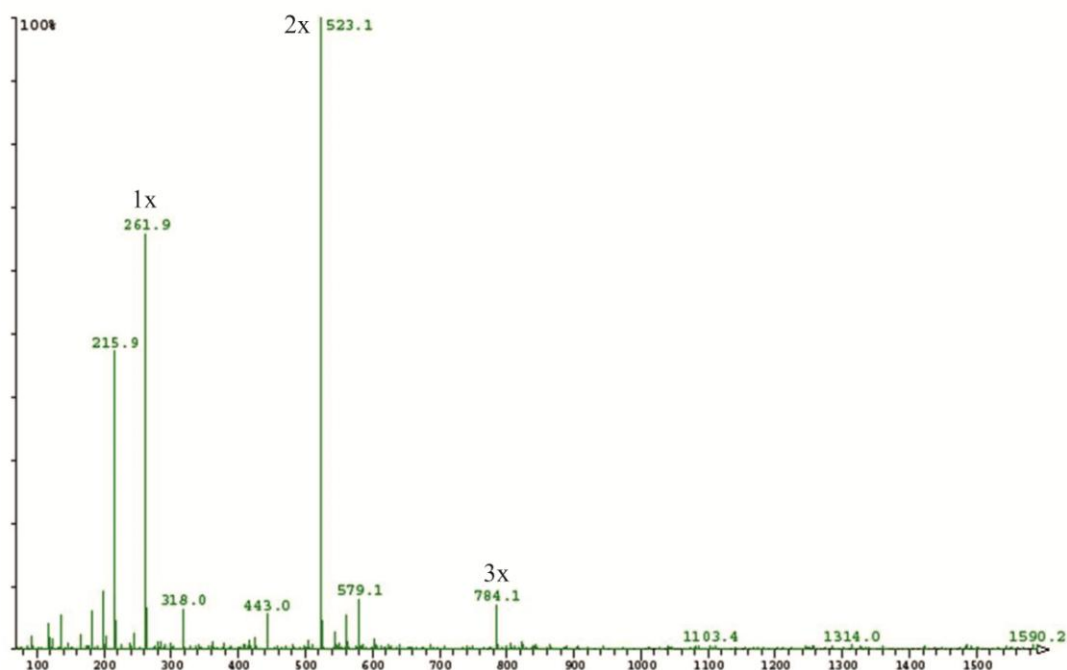
**Abbildung 79:** AFM-Bild und Phasenbild nach dem *Spincoating* 3mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung bei pH = 2,5, mit Zugabe von NaCl.

Die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen bestätigen somit die Ergebnisse der *Nanoparticle Tracking Analysis*. Durch die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich der pH-Wert eine Rolle bei der Bildung der Aminosäurevesikel spielt und unabhängig von der verwendeten Base ist.

Mit der Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS) wurde die Clusterbildung der Aminosäuren untersucht. Dazu wurden 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösungen bei den pH-Werten pH = 2,5, pH = 7,1 und pH = 8,8 im positiv- und negativ-Modus im Massenspektrometer vermessen. Der pH-Wert wurde mit NH<sub>3</sub>-Lösung eingestellt, damit weniger Störquellen vorhanden sind. Die Proben wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit Methanol vermischt, um eine bessere Ionisation zu erhalten.

Um auszuschließen, dass Methanol einen Einfluss auf die Vesikelbildung hat, wurden NTA-Messungen durchgeführt. Es wurde ein Blindwert sowie eine Probe vermessen. Der Vesikeldurchmesser von *O*-Phospho-L-Tyrosin, gemischt mit Methanol und einem pH-Wert von 9, eingestellt mit  $\text{NH}_3$ -Lösung, liegt bei 200 nm und die Vesikelkonzentration bei  $0,7 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Bei dem Blindwert für das Methanol-Wasser-Gemisch konnte der Partikeldurchmesser nicht bestimmt werden; die Partikelkonzentration lag bei  $0,05 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  und entspricht dem Blindwert für Reinstwasser.

In **Abbildung 80** ist das ESI-Massenspektrum im positiv-Modus von *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 2,5 gezeigt. Hier ist bei  $m/z = 262$  das Monomer der protonierten Aminosäure TyrP zu sehen. Bei  $m/z = 523$  und  $m/z = 784$  sind die Signale des protonierten Dimers ( $2 \cdot 261 + 1$ ) und Trimers ( $3 \cdot 262 + 1$ ) zu sehen. Der Peak des Trimers ist aber noch nicht sehr stark ausgebildet, so dass die Aminosäure bei einem pH = 2,5 hauptsächlich als Monomer und Dimer vorliegt.

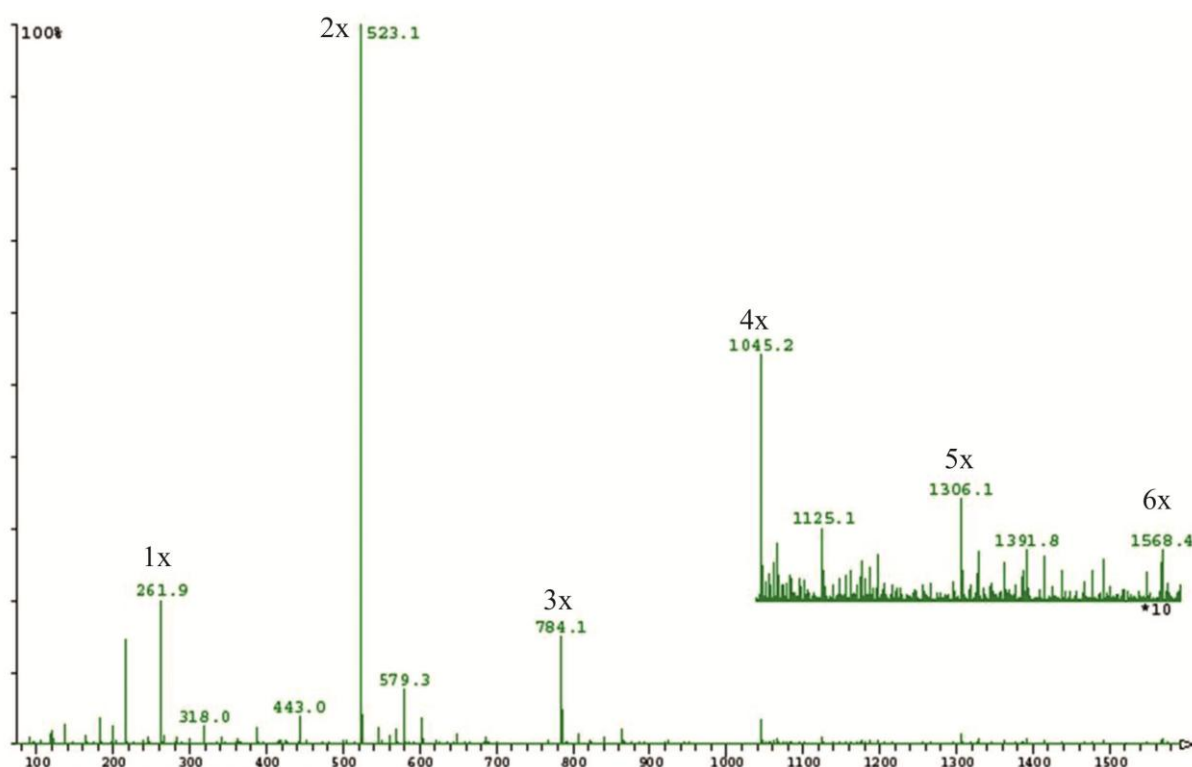


**Abbildung 80:** ESI-MS-Messung von 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 2,5.



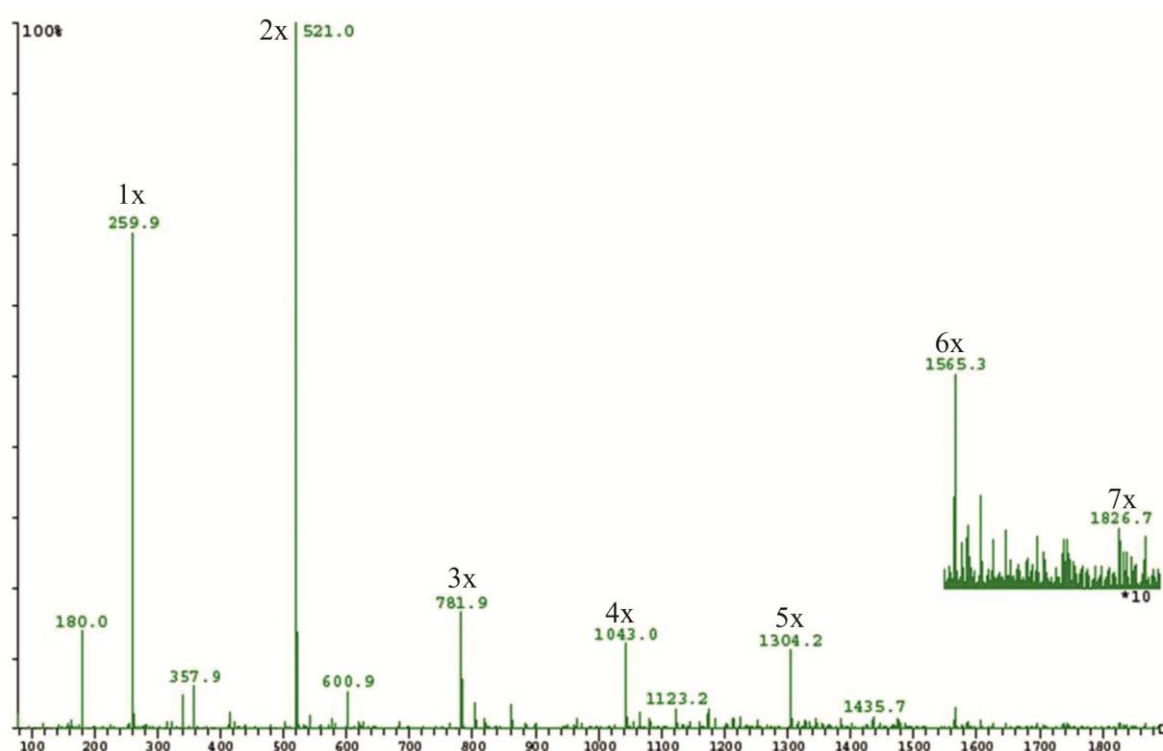
Da durch die im Folgenden gezeigte pH-Wert-Erhöhung eine Verschiebung zu größeren Clustern zu beobachten ist, kann eine Clusterung infolge der Ionisation nahezu ausgeschlossen werden.

Wenn nun der pH-Wert von *O*-Phospho-L-Tyrosin mit  $\text{NH}_3$ -Lösung auf 7,1 erhöht wird und dann eine ESI-MS-Messung im positiv- und negativ-Modus durchgeführt wird, können nun sogar bei  $m/z = 1568$  Hexamere ( $6 \cdot 261 + 1 = 1567$ ) der Aminosäure beobachtet werden. In **Abbildung 81** ist das positiv-Massenspektrum von *O*-Phospho-L-Tyrosin dargestellt. Weiter lässt sich erkennen, dass der Peak des Monomers kleiner geworden ist und der des Trimers größer. Es sind neben den Monomeren, Dimeren, Trimeren und Hexameren auch Tetramere ( $m/z = 1045$ ) und Pentamere ( $m/z = 1306$ ) der Aminosäure im Massenspektrum zu sehen.



**Abbildung 81:** ESI-MS-Messung von 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 7,1, eingestellt mit  $\text{NH}_3$ -Lösung.

Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes von TyrP auf 8,8 mit  $\text{NH}_3$ -Lösung und anschließender ESI-MS-Messung im positiv- und negativ-Modus sind nun sogar Heptamere im Massenspektrum zu beobachten. Das in **Abbildung 82** gezeigte Massenspektrum von TyrP ist im negativ-Modus aufgenommen worden. Der Peak des Heptamers ist hier bei  $m/z = 1827$  zu sehen. Der Peak des Hexamers ( $m/z = 1565$ ) ist deutlich ausgeprägter als in **Abbildung 81**.



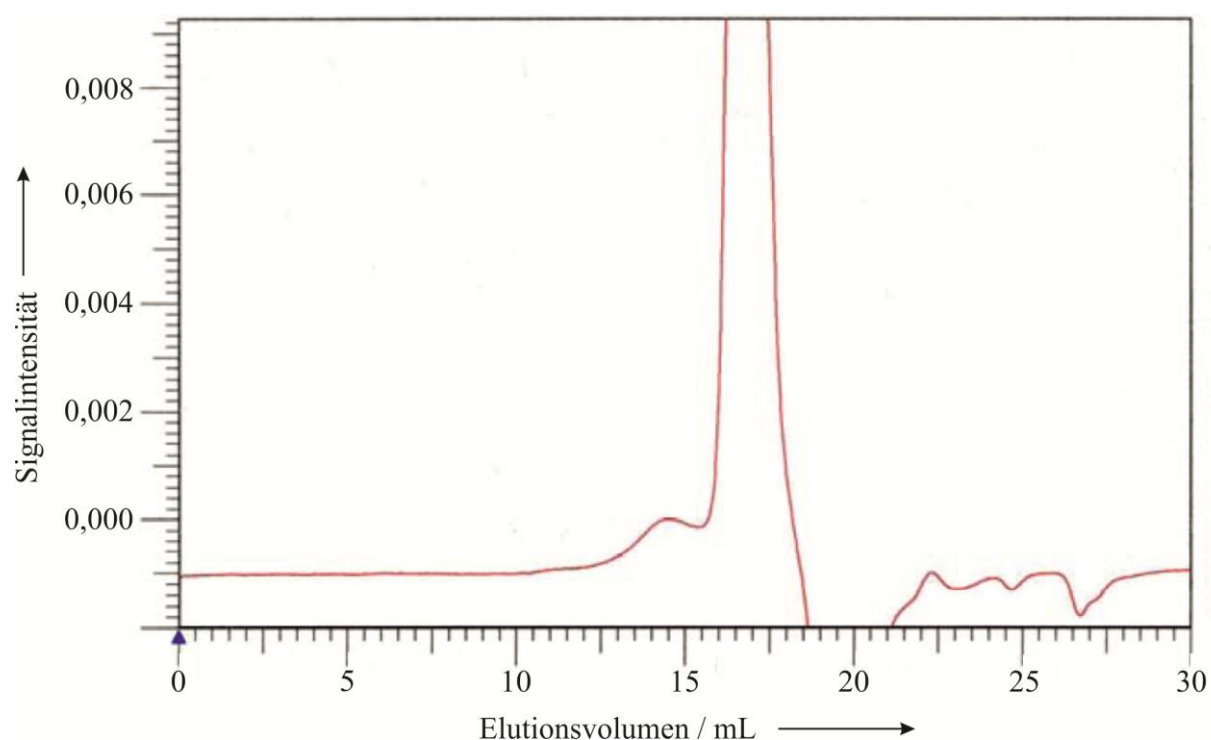
**Abbildung 82:** ESI-MS-Messung von 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei einem pH-Wert von 8,8, eingestellt mit  $\text{NH}_3$ -Lösung.

Durch die ESI-MS zeigt sich bei Abwesenheit von methodischen Artefakten, dass mit steigendem pH-Wert eine Zunahme der Aminosäureagglomerate bis hin zum Heptamer stattfindet. Durch die Verwendung von Ammoniaklösung und das Erkennen der Molekülpeaks kann eine Verbrückung mit den Gegenionen ausgeschlossen werden. Da das Masse-Ladungs-Verhältnis immer nur ein Vielfaches der Aminosäure zeigt, kann hier von einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Aminosäuremolekülen ausgegangen werden. Eine

kovalente Verknüpfung der Aminosäuremoleküle kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da sie erstens in Wasser nicht möglich ist und zweitens eine Massenänderung stattfinden müsste.

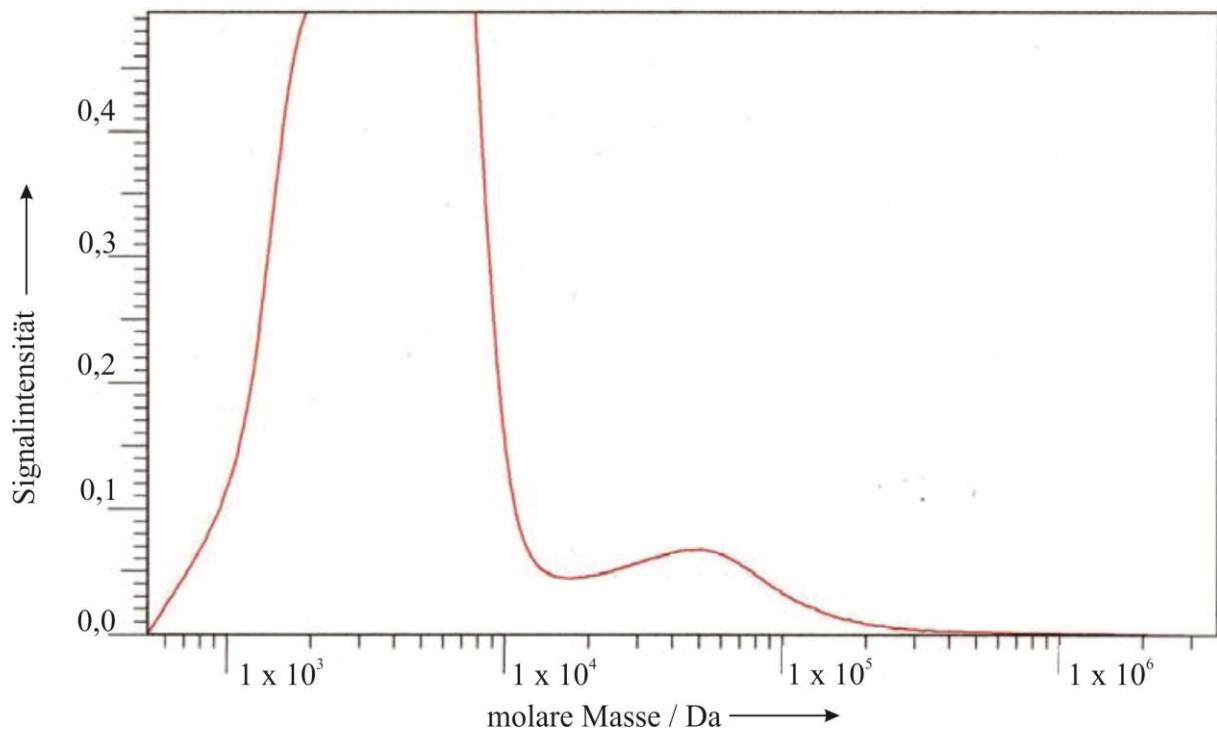
Es konnte somit gezeigt werden, dass Aminosäuren bzw. *O*-Phospho-L-Tyrosin in Abhängigkeit des pH-Wertes Oligomere bilden und keine Verbrückung über Gegenionen stattfindet. Deutlich größere Oligomere als das Heptamer lassen sich mit der ESI-MS nicht nachweisen.

Für die Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin wurde auch ein Größenausschlusschromatogramm angefertigt. Die TyrP-Lösung hatte eine Konzentration von  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  und wurde auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Wie dem Chromatogramm in **Abbildung 83** zu entnehmen ist, gibt es zwei Peaks. Ein kleinerer Nebenpeak ist bei einem Elutionsvolumen von 14 mL, der Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von 17 mL zu beobachten.



**Abbildung 83:** Größenausschlusschromatogramm einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin Lösung mit einem pH-Wert von 10.

Aus diesen Peaks ergibt sich, dass der Nebenpeak eine ca. zehn mal höhere molare Masse aufweist als der Hauptpeak. Bei den Aminosäurevesikeln handelt es sich nicht um massive Partikel, daher ist es nicht sicher, dass sich die Vesikel wie massive Partikel oder Polymerketten in Bezug auf ihre Größe verhalten. Es ist jedoch ein weiterer Nachweis, dass ein Teil der Aminosäure agglomeriert als Vesikel vorliegt.



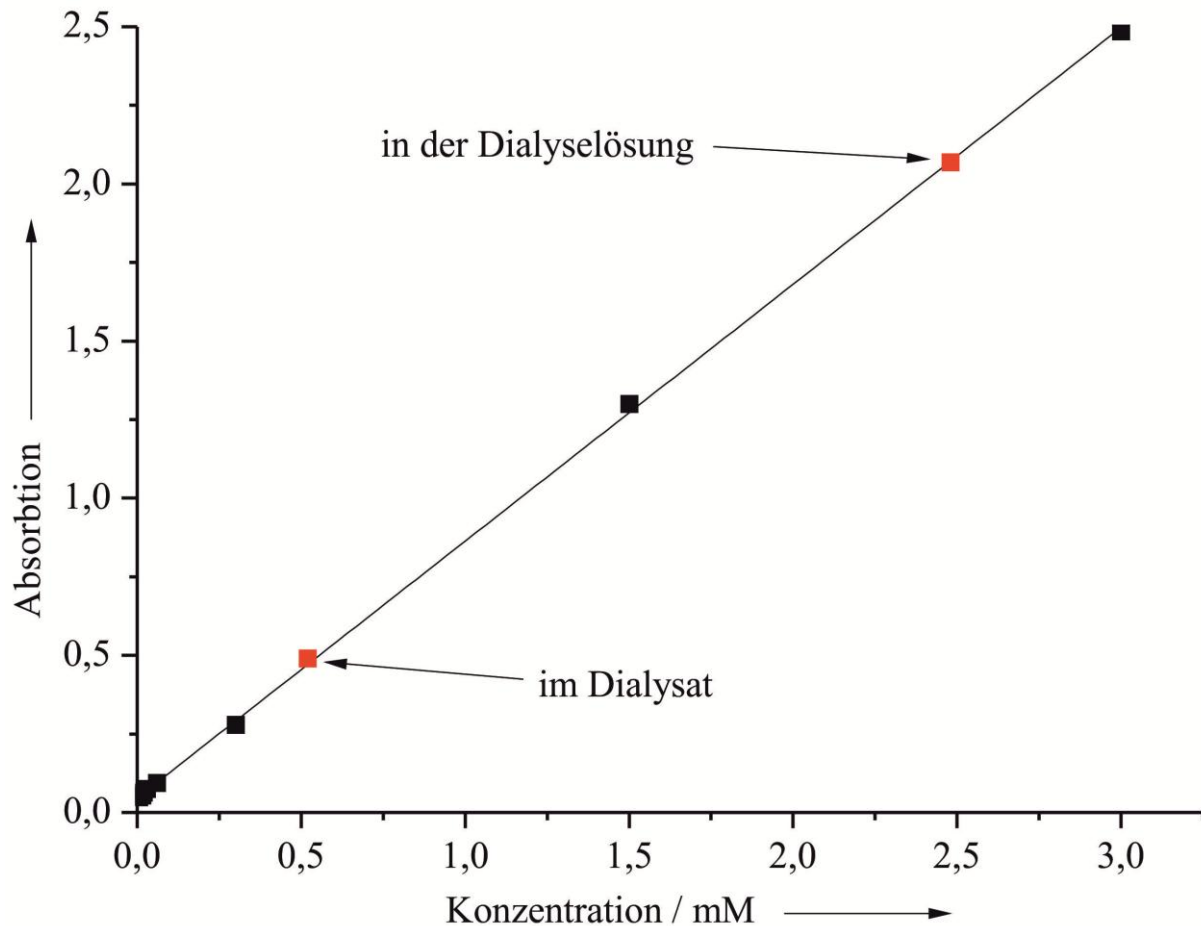
**Abbildung 84:** Molmassenverteilung aus der Größenausschlusschromatografie von TyrP.

Das in **Abbildung 84** gezeigte Diagramm ist die aus dem Chromatogramm bestimmte Molmassenverteilung. Da keine Kalibration stattgefunden hat, können diese Werte nur relativ zueinander ausgewertet werden. Aus den Integralen der zwei Peaks geht hervor, dass ca. 5 % der Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin als Agglomerat bzw. Vesikel vorliegen. Um Effekte durch Staub und Verunreinigungen der *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung auszuschließen, wurden Filtrations-, Verdünnungs- und Dialyseversuche, die nachfolgend gezeigt sind, durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die Vesikelbildung der Aminosäuren ein reversibler Prozess ist und um Verunreinigungen bzw. Staub auszuschließen, wurde eine 3 mM-Lösung der Aminosäure *O*-Phospho-L-Tyrosin mit Hilfe der Dialyse untersucht. Dazu wurde der pH-Wert der Dialyselösung und des Dialysats mit  $\text{NH}_3$ -Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Die Porengröße des Dialyseschlauchs lag bei 100 bis 400 Da. Neben der Aminosäurelösung wurde auch ein Blindwert für Reinstwasser mit einem pH-Wert von jeweils 9 durchgeführt. Die Dialyselösung sowie das Dialysat wurden mit Hilfe der NTA, der UV/Vis-Spektroskopie und der AFM analysiert.

Mittels der NTA konnten im Dialysat nur wenige Aminosäurevesikel nachgewiesen werden, da die Konzentration im Dialysat aufgrund der großen Verdünnung (1:100) zu gering ist.

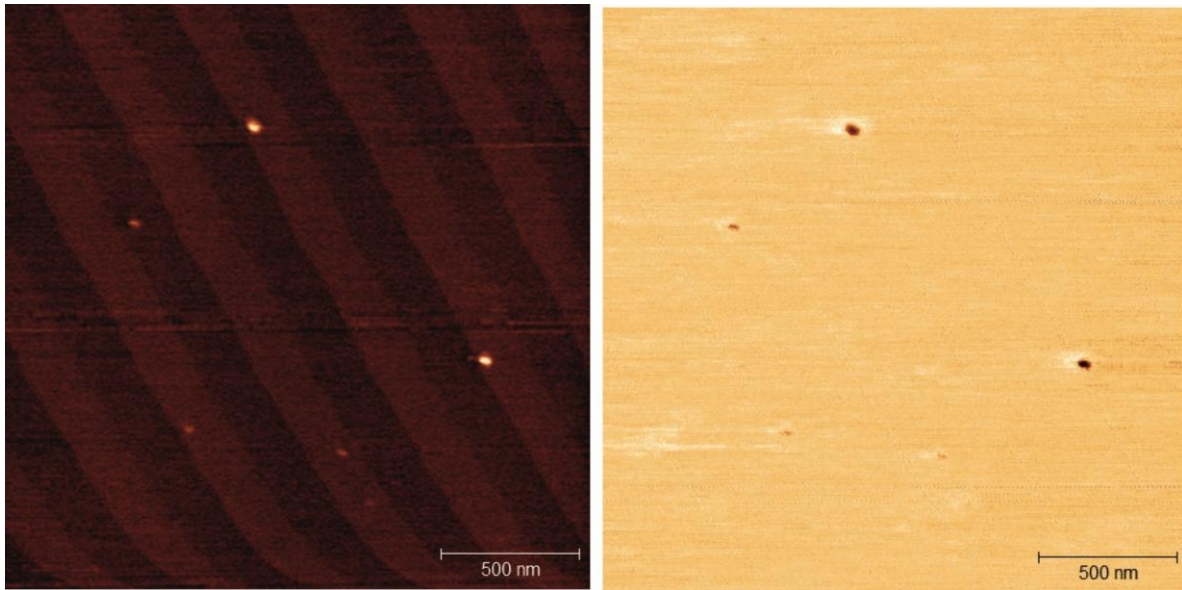
Für die UV-Spektroskopie wurde eine Kalibrierreihe angesetzt und anschließend das Dialysat und die Dialyselösung vermessen. In **Abbildung 85** ist die Kalibriergerade sowie die beiden Probenmessungen dargestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass ca.  $0,52 \text{ mmol L}^{-1}$  *O*-Phospho-L-Tyrosin durch den Dialyseschlauch in das Dialysat übergegangen sind, dies entspricht ca. 17,3 % Aminosäure im Dialysat. Da die Aminosäure auch im Dialysat nachgewiesen werden konnte, lagen entweder noch freie Aminosäuremoleküle vor oder die Vesikel haben sich im Dialyseschlauch aufgelöst und im Dialysat neu gebildet. Des Weiteren kann durch die Dialyse eine Verunreinigung der Aminosäure im Dialysat ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob sich im Dialysat tatsächlich Aminosäurevesikel gebildet haben, wurde vom Dialysat eine AFM-Analyse durchgeführt.



**Abbildung 85:** Kalibriergerade von *O*-Phospho-L-Tyrosin und der Messung der 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin Probe nach 24 h Dialyse des Dialysats und der Lösung im Dialyseschlauch (rote Punkte).

Im Dialysat des Reinstwasser waren keine Vesikel zu erkennen, so dass Messartefakte bzw. Verunreinigungen durch den Dialyseschlauch ausgeschlossen werden können.

Im Dialysat der *O*-Phospho-L-Tyrosin sind Vesikel zu erkennen. Der Durchmesser der Vesikel beträgt um die 50 nm und die Höhe der Partikel liegt bei 2-3 nm, wie in **Abbildung 86** gezeigt. Die Messwerte stimmen mit den gemessenen AFM-Daten für eine nicht dialysierte *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung bei einem pH von 9 überein.



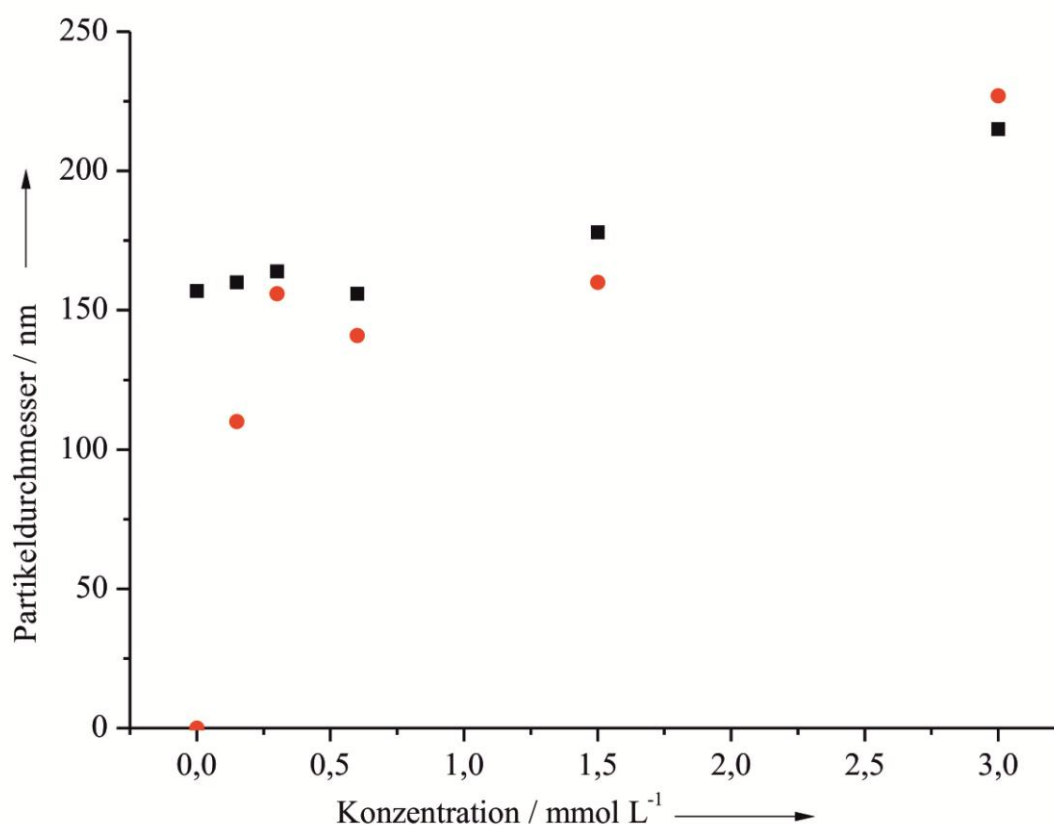
**Abbildung 86:** AFM und Phasenbild des Dialysats nach dem *Spincoating* einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin bei pH = 9.

Das Phasenbild der AFM-Messung spricht auch hier dafür, dass es sich um Vesikel handelt. Die Partikeldichte auf dem Probenträger ist wesentlich geringer, da in 24 h nur 17,3 % der Aminosäure in das Dialysat übergegangen sind, und das Dialysat zusätzlich noch 1:100 verdünnt ist. Somit beträgt die Aminosäurekonzentration im Dialysat  $0,0052 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Anhand der Dialysedaten kann gefolgert werden, dass es sich bei der Vesikelbildung aus Aminosäuren um einen reversiblen Prozess handelt. Die Porengröße des Dialyseschlauchs von ca. 25 bis 50 Å ist für die gebildeten Vesikel zu klein, so dass nur einzelne Aminosäuremoleküle durch die Poren gelangen. Des Weiteren können durch die Dialyse auch Verunreinigungen der Aminosäure und Staub ausgeschlossen werden.

### 5.2.1.1 Konzentrationsabhängige Bildung der Aminosäurevesikel

Um Verunreinigungen der Lösung und der Messzelle auszuschließen, wurde eine 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung auf einen pH-Wert von 9 eingestellt und zusätzlich mit einem 20 nm Anotopfilter filtriert. Mittels NTA wurden je eine filtrierte und eine unfiltrierte Aminosäurelösung vermessen. Die filtrierte Lösung zeigte wie die unfiltrierte Lösung Vesikel mit einem Durchmesser von um die 150 nm. Durch den Filtrationsversuch konnte so eine Verunreinigung der Messzelle sowie der Aminosäurelösung ausgeschlossen werden. Weiter wurde auch eine Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 0,25 mM der Aminosäurelösung angesetzt. In **Abbildung 87** ist der Durchmesser einer filtierten und einer unfiltierten *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen.

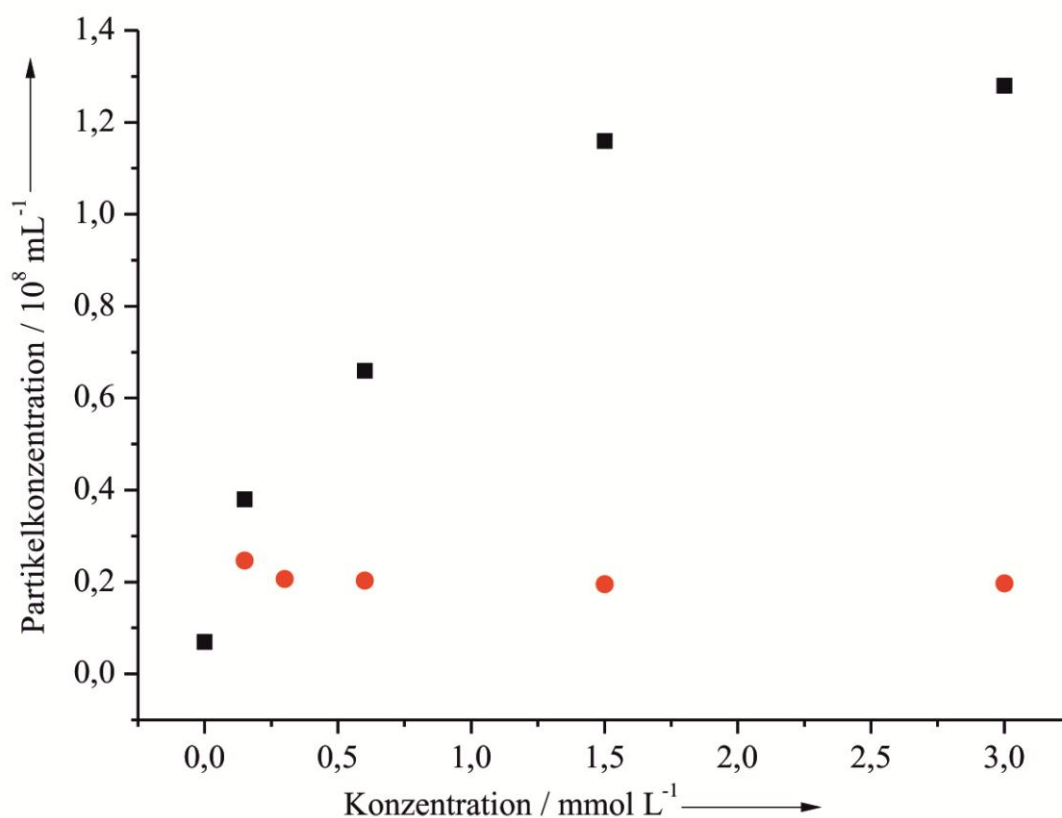


**Abbildung 87:** NTA einer unfiltierten (schwarz) und einer filtierten (rot) *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung bei verschiedenen Konzentrationen, aufgetragen gegen den Partikeldurchmesser.



Durch das Filtrieren sowie das Verdünnen sind im Rahmen der Fehlertoleranz keine signifikanten Unterschiede bei den Messwerten für den Durchmesser der Vesikel zu erkennen. Die gemessene Partikelgröße des Blindwertes der unfiltrierten Probe ist auf leichte Verunreinigungen zurückzuführen.

Bei der Partikelkonzentration sind hingegen deutliche Unterschiede zwischen den filtrierten und den unfiltrierten Lösungen zu sehen. Während bei der Verdünnungsreihe der filtrierten Proben kein Unterschied in der Partikelkonzentration zu sehen ist, lässt sich bei der unfiltrierten Probe ein signifikanter Anstieg der Partikelkonzentration mit steigender Konzentration der Aminosäurelösung erkennen. Diese Messwerte sind in **Abbildung 88** dargestellt.



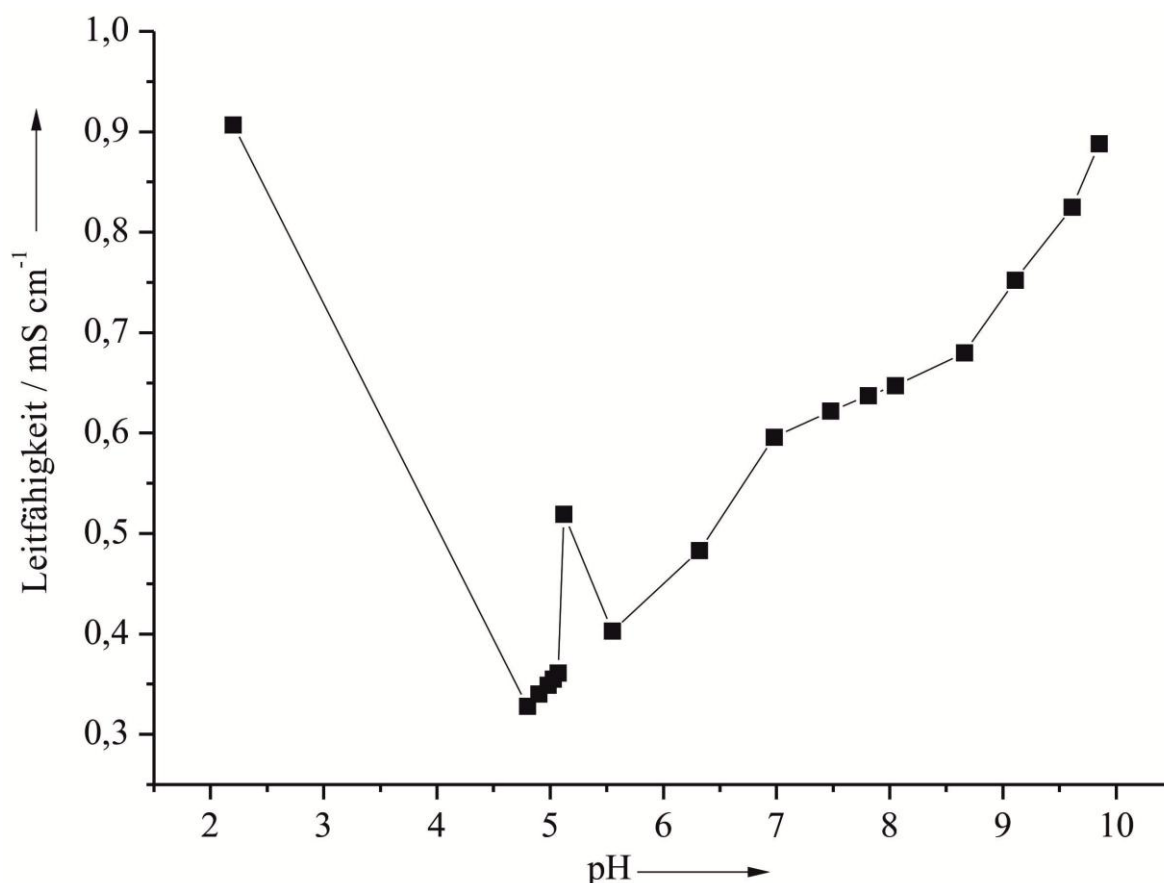
**Abbildung 88:** NTA einer unfiltrierten (schwarz) und einer filtrierten (rot) *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung bei verschiedenen Konzentrationen, aufgetragen gegen die Partikelkonzentration.

Da auch bei der Partikelkonzentration der filtrierten Probe kein signifikanter Unterschied zu sehen ist, können Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Des Weiteren kann gesagt werden, dass es sich bei der Vesikelbildung um einen reversiblen Prozess handelt. Der markante Unterschied zwischen der filtrierten und unfiltrierten Probe kann dadurch erklärt werden, dass die Vesikel durch die Filtration zerstört werden und sich nicht so schnell neu bilden können. So hat eine frisch filtrierte Probe eine Vesikelkonzentration von  $0,20 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Nach 24 Stunden ist die Vesikelkonzentration auf  $0,57 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  angestiegen, die unfiltrierte Probe hatte eine Vesikelkonzentration von  $1,08 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ .

Anhand der Filtrations- und Dialyseversuche können Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

### 5.2.1.2 pH-Wert-Einfluss auf die Aminosäurevesikel

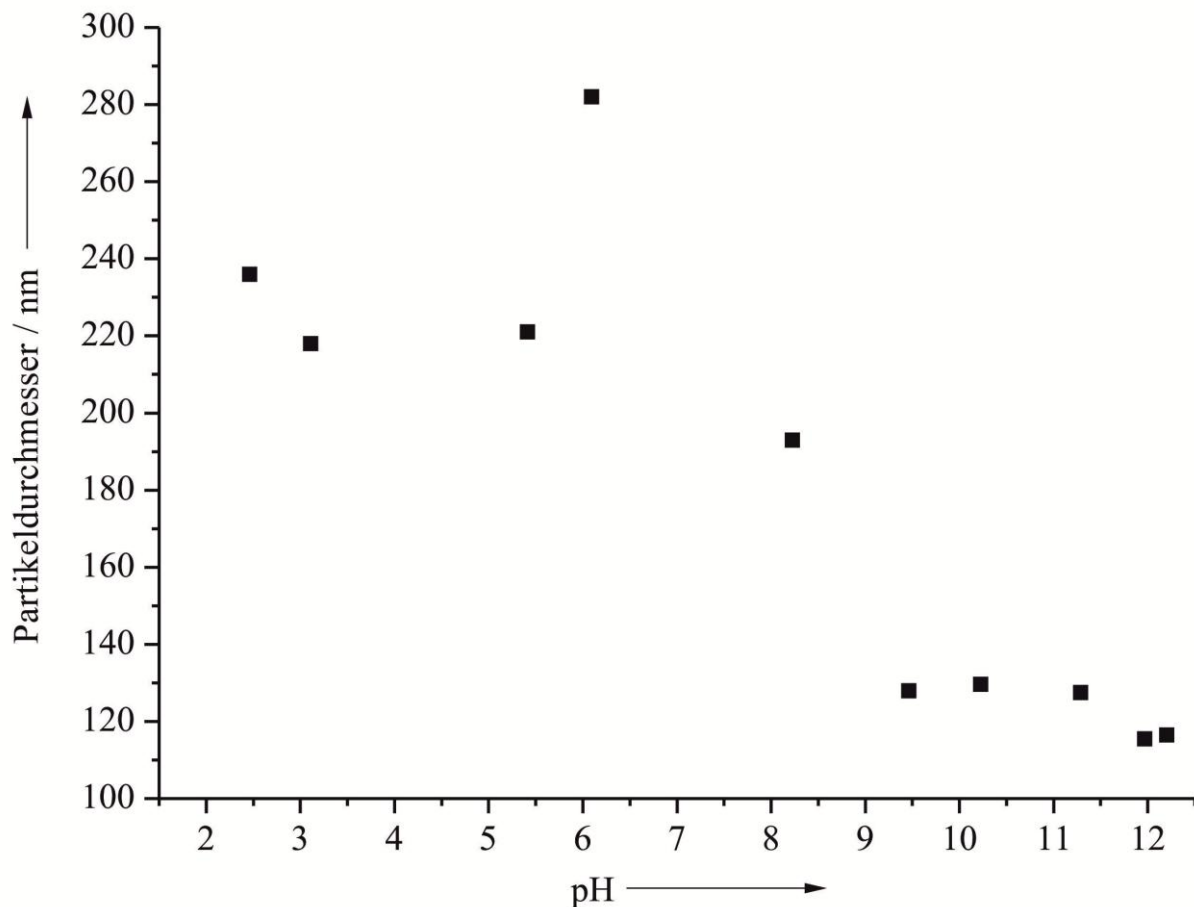
Um zu sehen, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Bildung der Vesikel sowie auf die Vesikel selbst hat, wurde zuerst eine Probe mit dem Autotitrator von pH = 2,2 bis pH = 9,85 mit NaOH titriert und die elektrische Leitfähigkeit gemessen. In **Abbildung 89** ist grafisch der Verlauf der Leitfähigkeit gegen den pH-Wert aufgetragen.



**Abbildung 89:** pH-Wert-Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung.

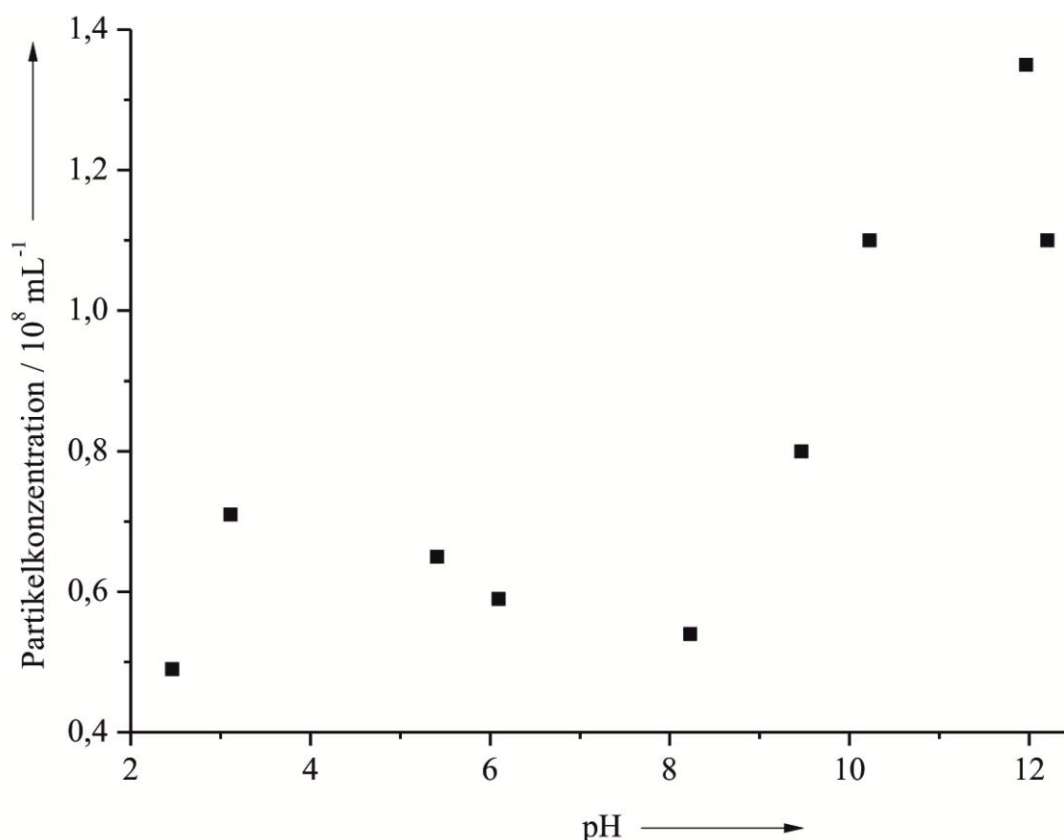
Zwischen den pH-Werten 2,2 und 4,6 fällt die Leitfähigkeit von 0,9 auf 0,328 mS cm<sup>-1</sup> ab und steigt dann wieder bis pH = 10 auf ca. 0,9 mS cm<sup>-1</sup> an. Bei diesem pH-Wert liegt auch der isoelektrische Punkt von *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Bei dem Durchmesser der Vesikel ist kein Zusammenhang mit dem pH-Wert zu sehen, wie in **Abbildung 90** gezeigt.



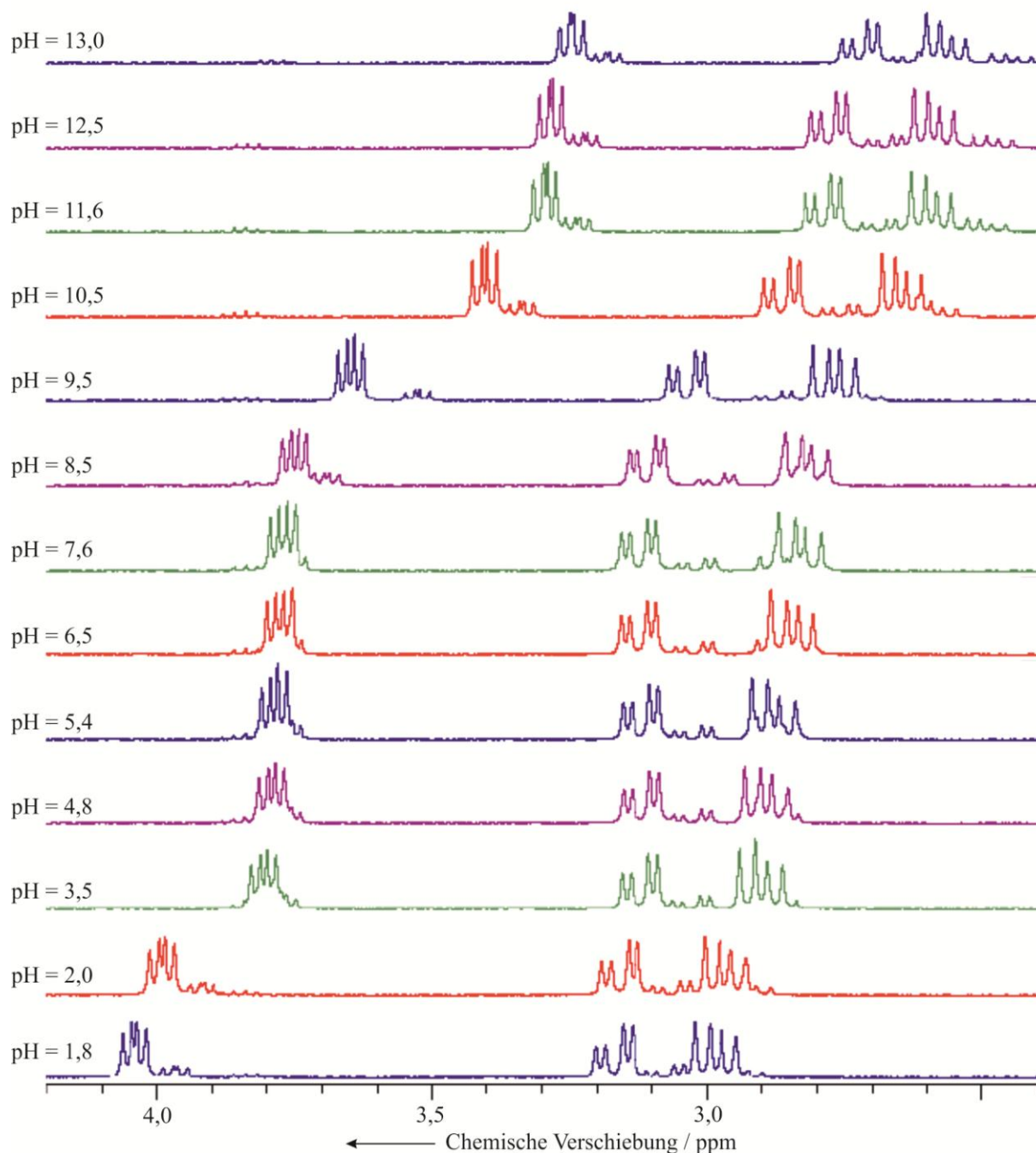
**Abbildung 90:** Partikeldurchmesser bestimmt mittels NTA, einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes, titriert mit NaOH.

Die Konzentration steigt ab einem pH-Wert von 8 bis 9 stark an und bleibt bei einer Vesikelkonzentration von  $1,1 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  bis  $1,3 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ , wie in **Abbildung 91** gezeigt. Bis zum Erreichen von  $\text{pH} = 8$  liegt die Vesikelkonzentration im Bereich des Blindwertes für Reinstwasser. Diese Werte stimmen auch mit den vorher gezeigten pH-Werten zur Bildung der Vesikel überein.



**Abbildung 91:** Partikelkonzentration, bestimmt mittels NTA, einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes, titriert mit NaOH.

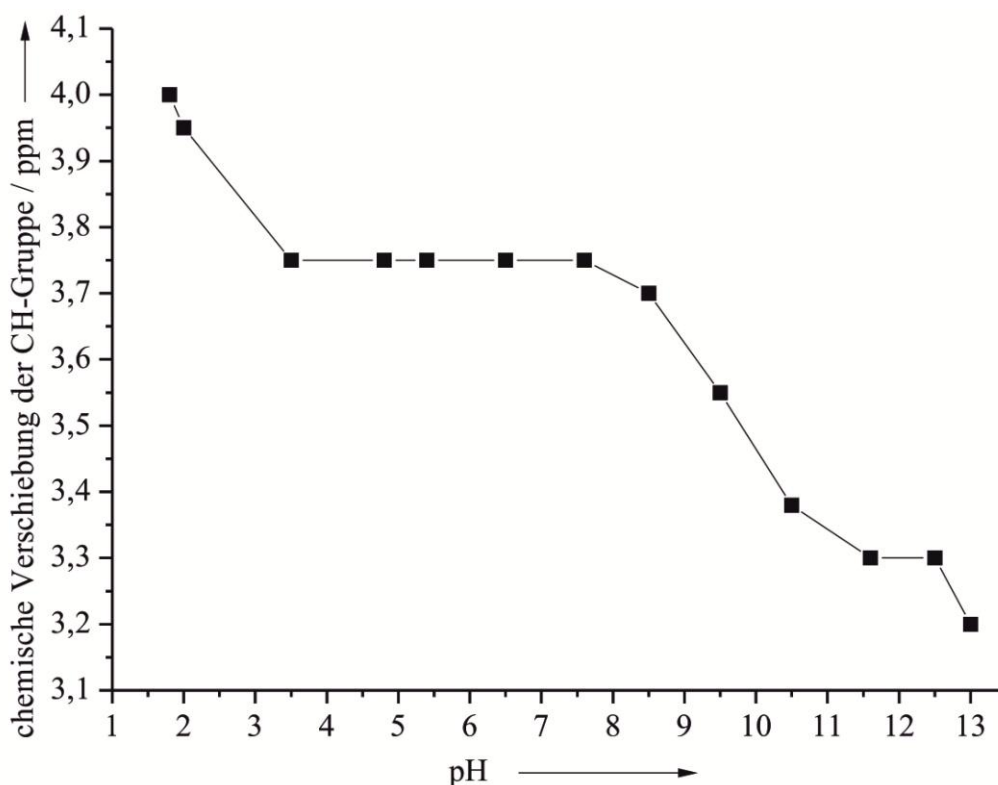
Neben den kolloidchemischen Messmethoden kam auch die NMR zum Einsatz. Für die NMR-Analyse wurde *O*-Phospho-L-Tyrosin in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOD auf verschiedene pH-Werte zwischen  $\text{pH} = 1,8$  und  $\text{pH} = 13$  eingestellt. Der in **Abbildung 92** gezeigte Verlauf der chemischen Verschiebung der CH-Gruppen in Abhängigkeit des pH-Wertes gleicht dem einer Titrationskurve. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  gemessen, und es sind die Signale für *O*-Phospho-L-Tyrosin, wie in der Literatur<sup>[110]</sup> beschrieben, zu sehen. Die Signale bei  $\sigma = 2,70$  bis  $3,7$  ppm sind der  $\text{CH}_2$ -Gruppe (2H) zuzuordnen. Die Signale bei  $\sigma = 4,08$  bis  $3,40$  ppm sind der CH Gruppe (1H) zuzuordnen. Die Signale der 4 Wasserstoffatome am Aromaten bei  $\sigma = 7,01$  bis  $7,14$  sind in **Abbildung 92** nicht dargestellt.



**Abbildung 92:** pH-Wert abhängiges  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von *O*-Phospho-L-Tyrosin.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die NMR-Titration ein gängiges Verfahren ist und die Auftragung des pH-Wertes gegen die chemische Verschiebung ausreicht, um Dissoziationsgleichgewichte aufzuklären.<sup>[122-124]</sup>

Die chemische Verschiebung der CH-Gruppe in **Abbildung 92** stimmt sehr gut mit den aus der Literatur bekannten  $pK_s$ -Werten für *O*-Phospho-L-Tyrosin überein.<sup>[113]</sup> In **Abbildung 93** ist die Kurve der NMR-Titration gezeigt. Diese stimmt mit der Kurve der theoretischen Ladung (**Abbildung 39**) von TyrP überein.



**Abbildung 93:** Titrationskurve von *O*-Phospho-L-Tyrosin aus den NMR-Daten.

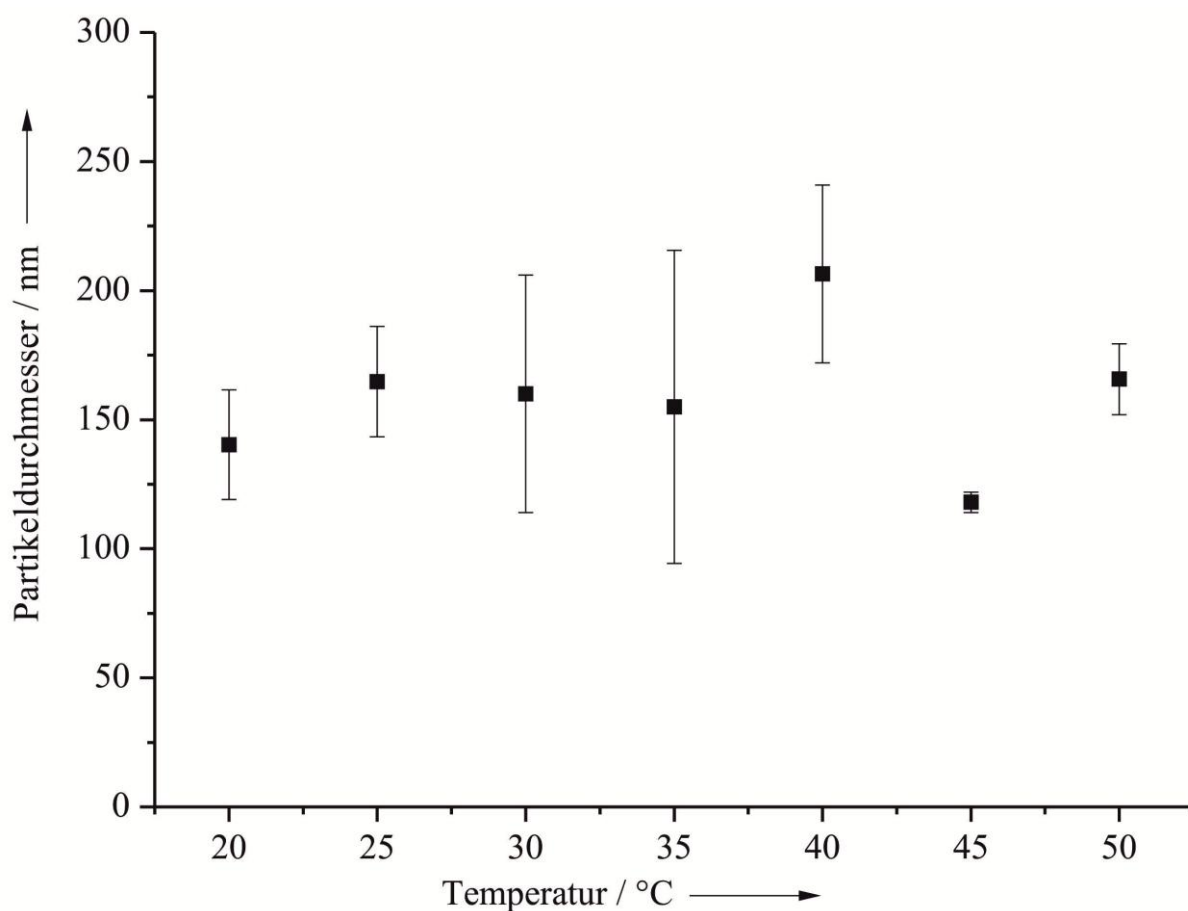
Die Abweichungen der  $pK_s$ -Werte zwischen den Literaturdaten und den gemessenen Daten können von den unterschiedlichen Solvatisierungen in  $D_2O$  im Gegensatz zu  $H_2O$  herrühren.

Weiter konnte mit Hilfe der NMR gezeigt werden, dass erwartungsgemäß keine neuen kovalenten Bindungen in Abhängigkeit des pH-Wertes gebildet wurden. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass die Vesikel lediglich durch elektrostatische Wechselwirkungen gebildet werden. Die NMR-Daten stimmen mit den zuvor gezeigten ESI-MS-Messungen überein.



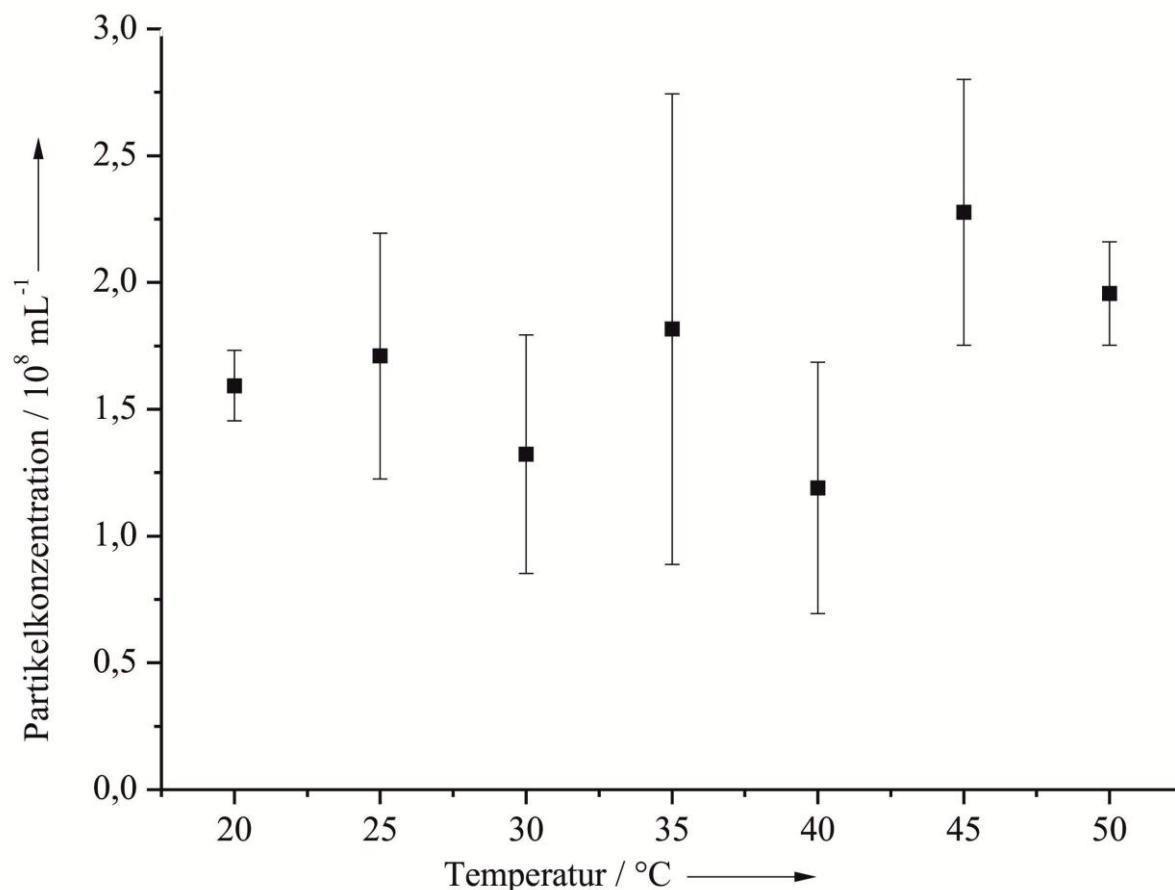
### 5.2.1.3 Temperaturstabilität der Aminosäurevesikel

Um zu sehen, wie stabil die Aminosäurevesikel gegenüber einer Temperaturerhöhung sind, wurde eine 3 mM TyrP-Lösung mit einem pH-Wert von 9 in 5 °C Intervallen von 20 °C auf 50 °C erhitzt. In **Abbildung 94** ist der Durchmesser der Aminosäurevesikel gegen die Temperatur aufgetragen. Im Rahmen der Fehlertoleranz ist hier keine signifikante Änderung im Durchmesser der Vesikel zu beobachten.



**Abbildung 94:** Partikeldurchmesser, bestimmt mittels NTA, einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur.

In **Abbildung 95** ist die Konzentration der Aminosäurevesikel von *O*-Phospho-L-Tyrosin gegen die Temperatur aufgetragen. Hier ist im Rahmen der Fehler-toleranz fast kein Unterschied in der Konzentration zu beobachten.

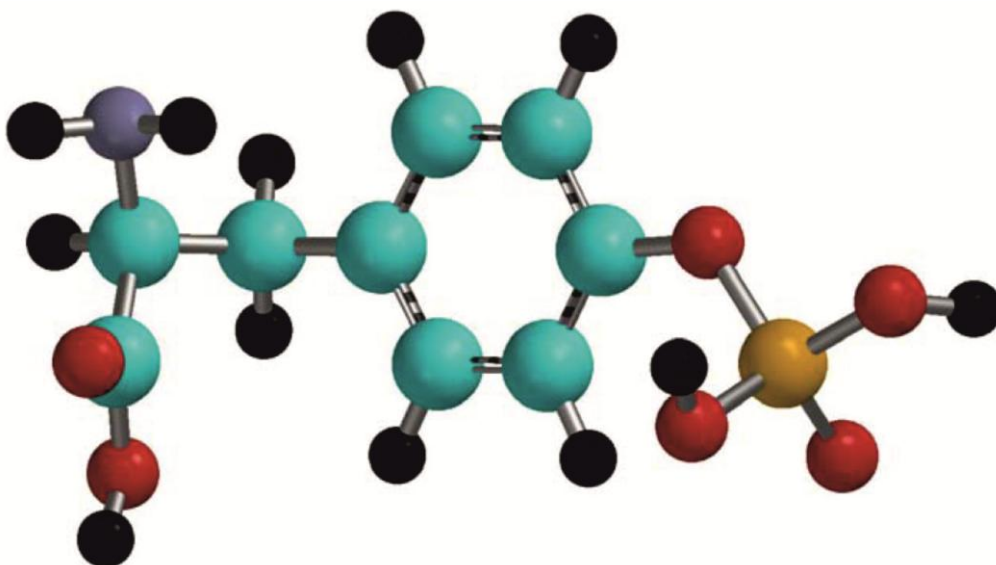


**Abbildung 95:** Partikelkonzentration, bestimmt mittels NTA, einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Abschließend zu den Temperatur-Untersuchungen lässt sich feststellen, dass eine Temperaturerhöhung keinen signifikanten Einfluss auf die Aminosäure-vesikel hat.

### 5.2.1.4 Theoretische Abschätzung des Aminosäureanteils in den Vesikeln

Um eine grobe theoretische Abschätzung der in den Aminosäurevesikeln enthaltenen Aminosäuremoleküle zu bekommen, wurde *O*-Phospho-L-Tyrosin mit Hilfe der Software „SPARTAN“ gezeichnet und eine MMFF 94 Kraftfeld-Berechnung durchgeführt. In **Abbildung 96** ist die kraftfeldoptimierte Struktur von *O*-Phospho-L-Tyrosin gezeigt.



**Abbildung 96:** Struktur von *O*-Phospho-L-Tyrosin, optimiert durch eine MMFF 94-Kraftfeld-Berechnung.

Für die Bestimmung der Größen des Moleküls wurde eine Quaderstruktur mit den Kantenlängen der breitesten, längsten und höchsten Stelle des Moleküls gewählt. Diese Abmessung ergab eine Länge von 10,5 Å, eine Breite von 4,0 Å und eine Höhe von 4,3 Å. Das Volumen des angenommenen Quaders beträgt demnach 0,18 nm<sup>3</sup>. Daraus folgt, dass ein *O*-Phospho-L-Tyrosin-Molekül ein Volumen  $V_{AS} = 0,18 \text{ nm}^3$  hat. Der mittels NTA bestimmte Durchmesser eines TyrP-Vesikels liegt bei ca. 155 nm. Der Radius beträgt somit 77,5 nm. Mit der Annahme einer idealen Kugel für das Vesikel errechnet sich so aus dem Radius des Vesikels ein Volumen von:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

$$V = \frac{4}{3}\pi (77,5 \text{ nm})^3 \quad (8)$$

$$\underline{V \approx 1,949 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3}$$

In grober Näherung folgt ohne Wasser daraus, dass

$$\begin{aligned} \frac{V}{V_{AS}} &= \frac{1,949 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3}{0,018 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3} \\ &\approx \underline{10,8 \cdot 10^6} \end{aligned} \quad (9)$$

*O*-Phospho-L-Tyrosin-Moleküle in einem Vesikel enthalten sind.

Die Konzentration der TyrP-Lösung war bei der NTA-Analyse  $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Daraus ergibt sich, dass  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$  TyrP in einem mL enthalten sind. Durch Multiplikation mit der Avogadrokonstanten errechnet sich eine Molekülkonzentration von:

$$\begin{aligned} 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol mL}^{-1} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \\ \approx 1,81 \cdot 10^{18} \text{ mL}^{-1} \end{aligned} \quad (10)$$

Somit sind

$$\frac{1,81 \cdot 10^{18}}{10,8 \cdot 10^6} \approx 1,68^{11} \quad (11)$$

Vesikel in einem mL einer 3 mM *O*-Phospho-L-Tyrosin-Lösung zu erwarten. Durch die NTA ist bekannt, dass die Vesikelkonzentration bei  $3,68 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  liegt. Aus diesen Angaben und Berechnungen folgt ohne Wasser, dass etwa 2,19 ‰ der Aminosäuremoleküle in den Vesikeln enthalten sind.

Da diese Berechnungen auf einer Vielzahl von Annahmen beruhen, können diese Ergebnisse nur als sehr grobe Näherung angesehen werden. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass noch kleinere Vesikel, wie durch die AFM beobachtet, nicht mit der NTA nachgewiesen werden können.

Nach oben stehender Modellrechnung erfolgte die Berechnung der Aminosäureanteile in den Vesikeln. In **Tabelle 12** sind diese Ergebnisse dargestellt.

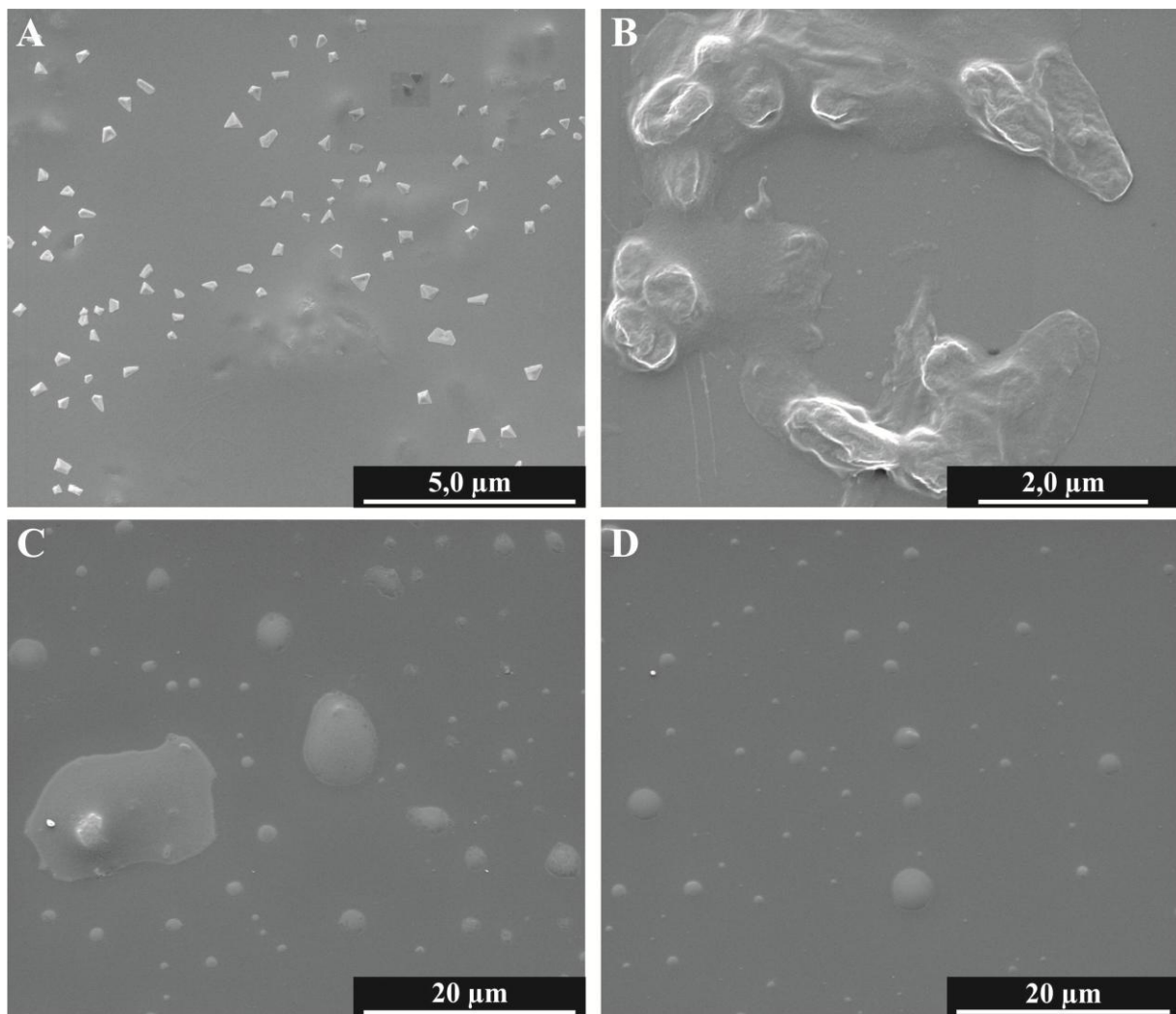
**Tabelle 12:** Aminosäureanteil in den Aminosäurevesikeln.

<b>Amino- säure / Dipeptid</b>	<b>Partikel- konzentration / <math>10^8 \text{ mL}^{-1}</math></b>	<b>Partikel- volumen / <math>10^{-21} \text{ m}^{-3}</math></b>	<b>Aminosäure- volumen / <math>\text{nm}^3</math></b>	<b>Aminosäure- anteil / ‰</b>
Glycin	0,99	1,63	0,05	1,78
L-Alanin	0,43	1,41	0,05	0,67
L-Serin	1,01	3,95	0,07	0,34
L-Tyrosin	0,61	5,08	0,12	0,14
<i>O</i> -Phospho- L-Tyrosin	3,86	1,94	0,18	2,19
Alanin- Tyrosin	0,51	16,30	0,20	0,23
Serin- Tyrosin	0,46	17,02	0,25	0,17

Der Aminosäureanteil oder Dipeptidanteil in den Vesikeln liegt je nach Aminosäure oder Dipeptid zwischen 0,14 und 2,19 ‰.

5.2.1.5 Rasterelektronenmikroskopische Abbildung der Vesikel

Für die rasterelektronenmikroskopische Abbildung der Aminosäurevesikel wurden verschiedene Trocknungsmethoden verwendet. Eine Probe von *O*-Phospho-L-Tyrosin wurde bei Raumtemperatur getrocknet, gezeigt in **Abbildung 97 A**. Eine weitere Probe von TyrP wurde bei 70 °C im Trockenschrank getrocknet (**Abbildung 97 B**). In beiden Fällen sind keine sphärischen Partikel zu erkennen, es ist jeweils nur ein Film der getrockneten Aminosäure zu sehen. In **Abbildung 97 C** und **Abbildung 97 D** sind dagegen viele kleine, runde Partikel zu sehen, die durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Gefriertrocknung erhalten wurden.

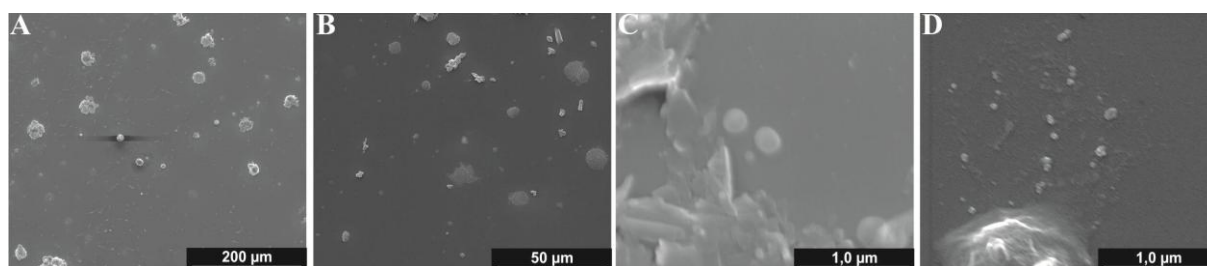


**Abbildung 97:** REM-Bilder von *O*-Phospho-L-Tyrosin A) getrocknet bei Raumtemperatur, B) getrocknet bei 70 °C, C) und D) getrocknet durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Gefriertrocknung.

Die in **Abbildung 97 C** und **D** gezeigten Partikel von *O*-Phospho-L-Tyrosin wurden in flüssigem Stickstoff zuerst schockgefroren und danach mit Hilfe der Lyophilisation getrocknet. Die hier gezeigten sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von ca. 2  $\mu\text{m}$ . Neben diesen großen Partikeln sind auch kleinere Partikel mit einem Durchmesser um die 500 nm zu sehen. Diese Partikel könnten von den Aminosäurevesikeln herrühren. Die Größendifferenz zu den *Nanoparticle Tracking Analysis* Untersuchungen und zu den rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen ist möglicherweise auf ein Wachstum der Partikel während der Lyophilisation zurückzuführen.

Es wurden auch rasterelektronenmikroskopische Abbildungen der Aminosäuren Glycin, L-Alanin, L-Serin und L-Tyrosin mittels Gefriertrocknung angefertigt. Neben den Aminosäuren wurden ebenfalls von den Dipeptiden Alanin-Tyrosin und Serin-Tyrosin rasterkraftmikroskopische Abbildungen angefertigt. Alle Aminosäure- und Dipeptidlösungen hatten eine Konzentration von 3 mM und wurden auf einen pH-Wert von 9 eingestellt.

Für die Serin- und Serin-Tyrosin-Lösung konnten keine sphärischen Partikel gefunden werden, die anderen Aminosäure- und Dipeptidlösungen zeigten sphärische Partikel, wie in **Abbildung 98** gezeigt.

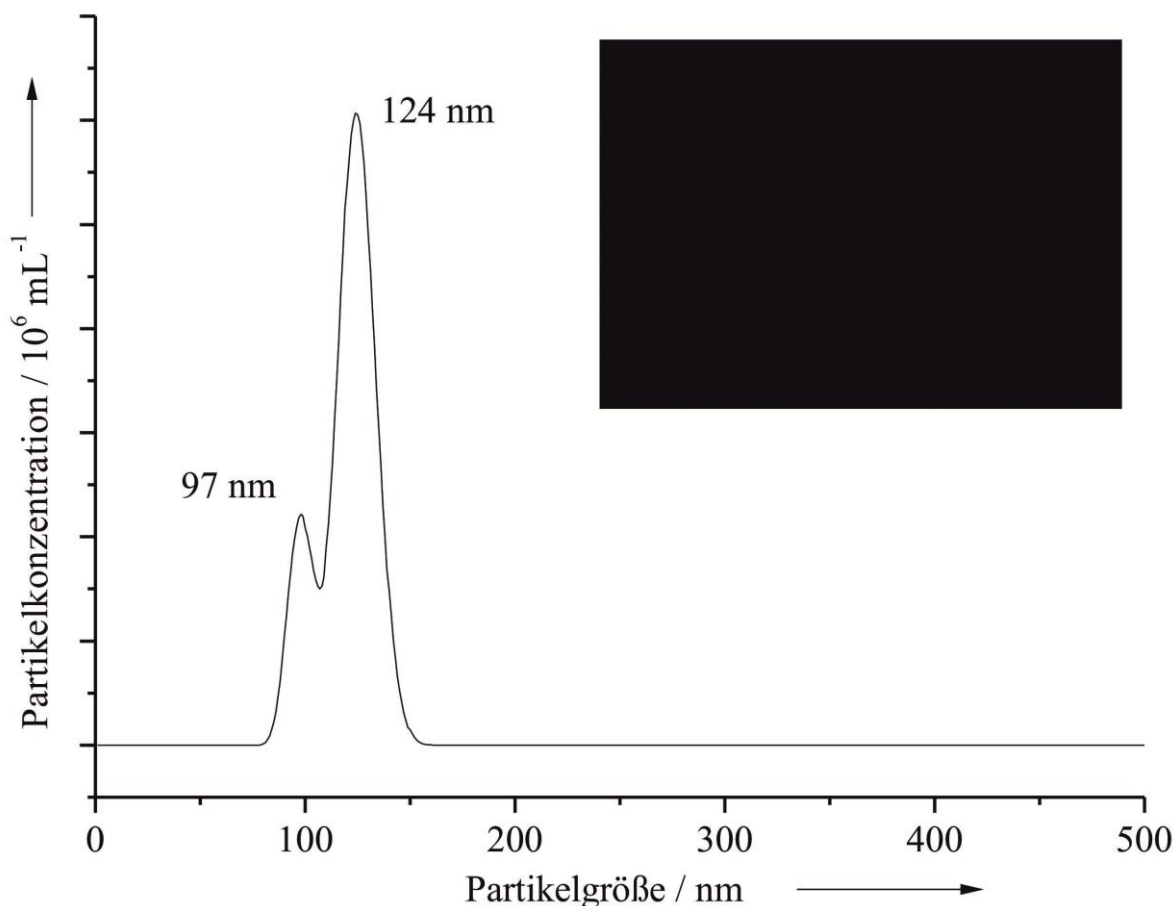


**Abbildung 98:** REM-Bilder von schockgefrorenem und gefriergetrocknetem A) Glycin, B) L-Alanin, C) L-Tyrosin und D) Alanin-Tyrosin.



### 5.2.2 Boc-Alanin-Lösung

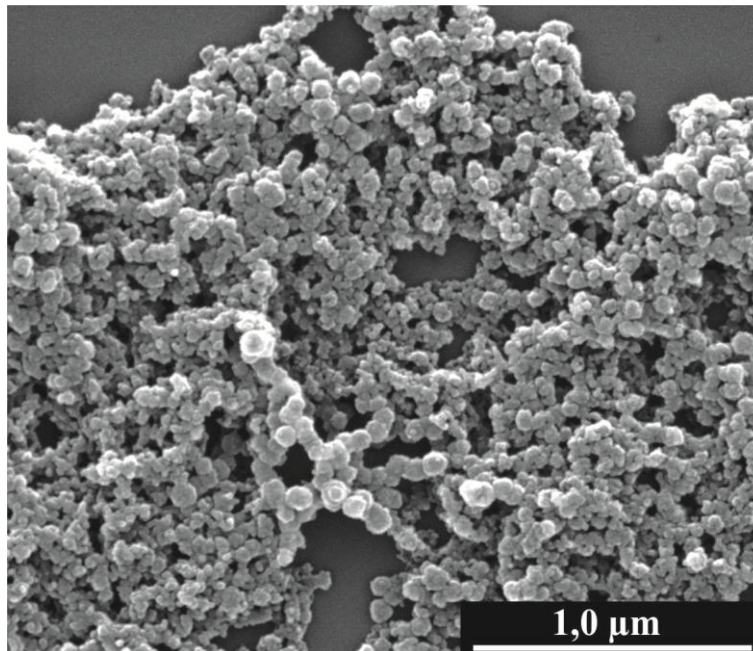
Um eine bessere Vorstellung der Vesikelbildung aus Aminosäuremolekülen zu bekommen, und um zu sehen, ob die Carboxyl- sowie die Aminogruppe zur Bildung von Vesikeln benötigt werden, wurde eine 3 mM Boc-Alanin-Lösung hergestellt. Bei Boc-Alanin ist die Aminogruppe durch eine Boc-Schutzgruppe geschützt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit NaOH auf pH = 9 eingestellt und mittels der NTA vermessen. Die mit der NTA beobachteten Durchmesser der Vesikel liegen zwischen 97 nm und 124 nm, wie in **Abbildung 99** zu sehen ist. Die Konzentration der Vesikel ist mit  $0,08 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  sehr gering und liegt im Bereich des Wasserblindwertes.



**Abbildung 99:** NTA von 3mM Boc-Alanin-Lösung mit Bild des Streulichts.

In dem in **Abbildung 99** gezeigten Streulichtbild ist ebenfalls, wie bei dem Blindwert für Wasser, fast kein Streulicht der Vesikel zu sehen.

Es wurde zudem versucht, Calciumphosphat-Hohlpartikel mit Boc-Alanin als Templat herzustellen. Wie das REM-Bild in **Abbildung 100** zeigt, sind im Vergleich zu den in Kapitel 5.1 gezeigten Hohlpartikeln sehr wahrscheinlich keine Hohlpartikel in Gegenwart von Boc-Alanin entstanden. Die in dem REM-Bild gezeigten Partikel gleichen eher kompakten Calciumphosphat-Nanopartikeln. Da von dieser Probe keine TEM- oder AFM-Bilder angefertigt wurden ist eine eindeutige Aussage nicht möglich.

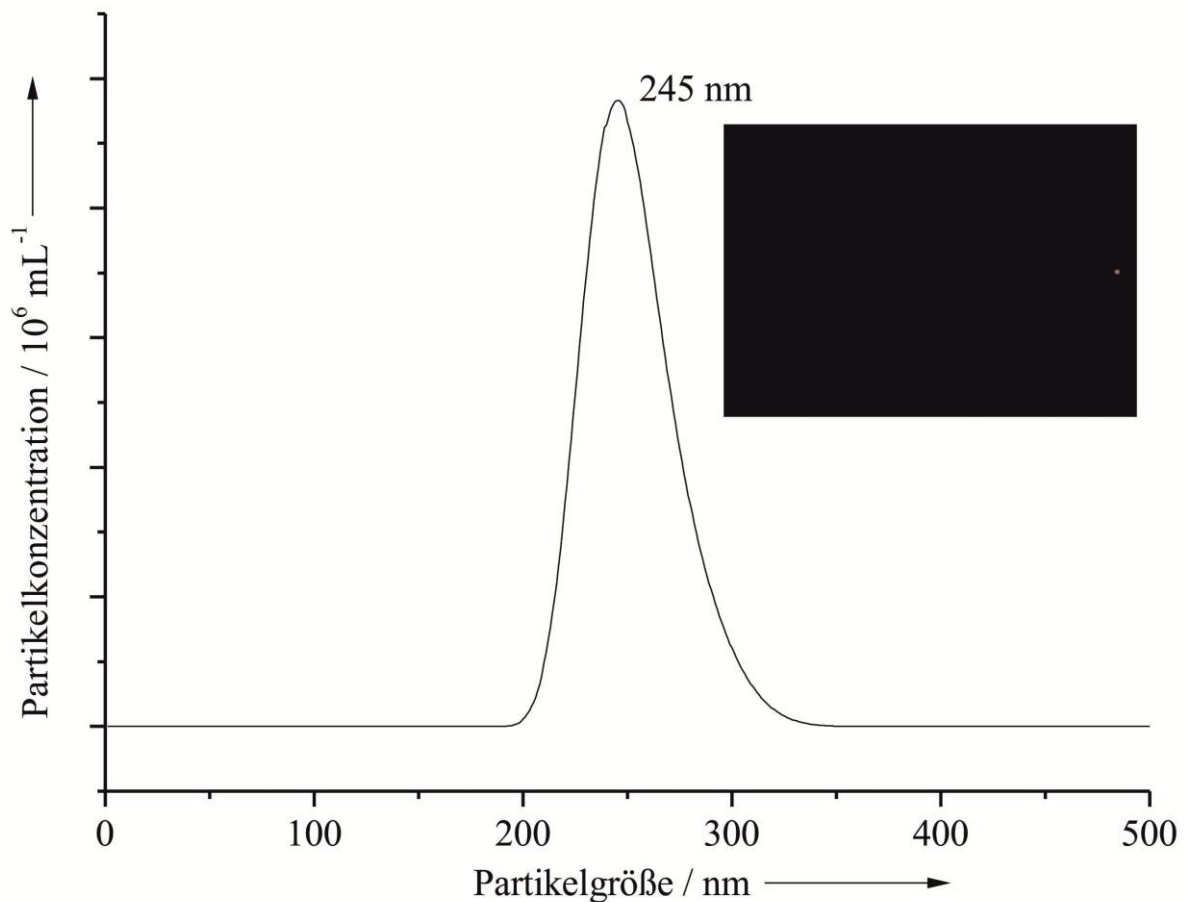


**Abbildung 100:** REM-Bild von Calciumphosphat-Nanopartikeln, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) Boc-Alanin.

Mit Boc-Alanin sind somit keine bis sehr wenige Vesikel zu beobachten. Es lassen sich vermutlich keine Hohlpartikel mit Boc-Alanin bilden. Somit werden für die Vesikelbildung sowohl die Carboxyl- als auch die Aminogruppe der Aminosäure benötigt.

### 5.2.3 Harnstoff-Lösung

Um die Beobachtungen aus Kapitel 5.2.2 zu bestätigen, wurde eine 3 mM Harnstoff-Lösung hergestellt und auf einen pH-Wert von 9 mit NaOH eingestellt. Es konnten vereinzelt Vesikel mit einer Größe von 245 nm beobachtet werden. Die Konzentration der Vesikel liegt mit  $0,25 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  etwas über dem Blindwert von Wasser. In **Abbildung 101** sind das Streulichtbild sowie die NTA-Daten dargestellt.

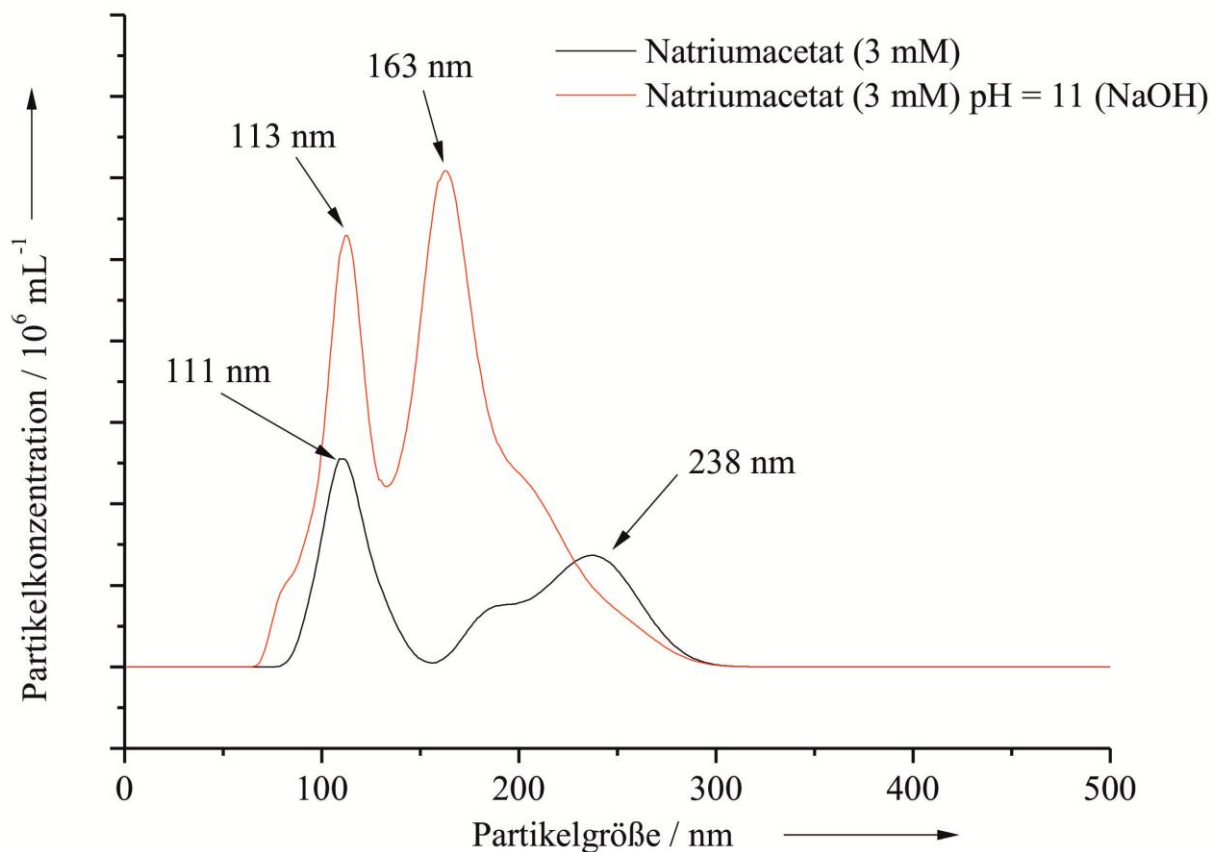


**Abbildung 101:** NTA von 3mM Harnstoff-Lösung mit Bild des Streulichts

Auch mit Harnstoff konnten nur wenige Vesikel nachgewiesen werden, so dass allem Anschein nach Vesikel ausschließlich bei Vorhandensein einer Carboxyl- und Aminogruppe gebildet werden können.

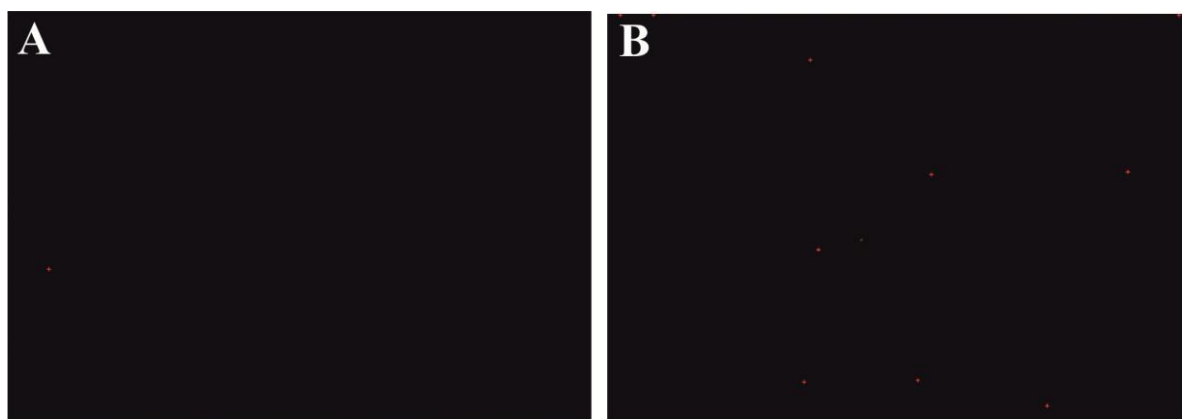
### 5.2.4 Natriumacetat-Lösung

Analog zur Harnstoff-Lösung wurde auch eine 3 mM Natriumacetat-Lösung hergestellt. Es wurde eine Lösung bei einem pH = 3 vermessen und eine weitere Lösung wurde auf einen pH = 11 mit NaOH eingestellt und vermessen. Die Vesikeldurchmesser liegen je nach pH-Wert zwischen 174 und 138 nm. Die Konzentration der Vesikel für die Lösung mit einem pH-Wert von 3, liegt bei  $0,18 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Für die auf pH = 11 eingestellte Lösung liegt die Konzentration der Vesikel bei  $0,51 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  und damit deutlich höher. In **Abbildung 102** sind die NTA-Kurven der Natriumacetat-Lösungen dargestellt.



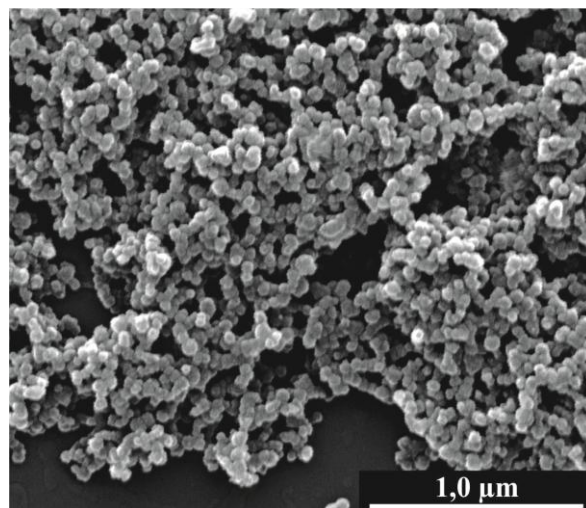
**Abbildung 102:** NTA von 3mM Natriumacetat-Lösung bei verschiedenen pH-Werten.

In den Streulichtbildern der **Abbildung 103 A** und **B** ist das mittels NTA beobachtete Streulicht zu sehen. Eine Zunahme des Streulichts mit steigendem pH-Wert ist zu erkennen.



**Abbildung 103:** Beobachtetes Streulicht mittels NTA einer 3mM Natriumacetat-Lösung A) bei pH = 3 und B) bei pH = 11, eingestellt mit NaOH.

Wie bei der Boc-Alanin-Probe wurde auch hier versucht, Calciumphosphat-Hohlpartikel herzustellen. Wie die rasterelektronenmikroskopische **Abbildung 104** zeigt, sind auch hier allem Anschein nach keine Hohlpartikel entstanden. Dem Anschein nach sind hier wie auch bei Boc-Alanin kompakte Calciumphosphat-Nanopartikel entstanden. Da von dieser Probe ebenfalls keine TEM- oder AFM-Bilder angefertigt wurden ist eine eindeutige Aussage nicht möglich.



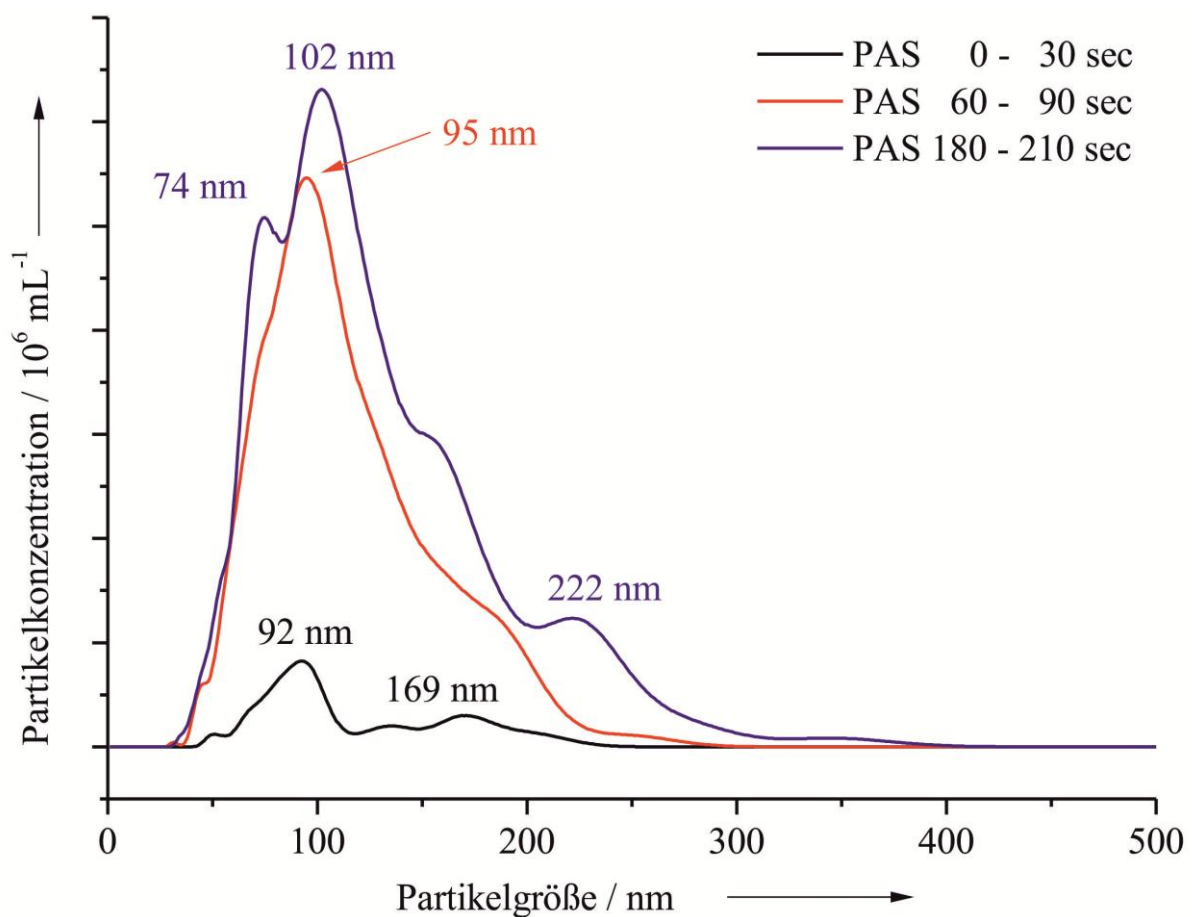
**Abbildung 104:** REM-Bild von Calciumphosphat-Nanopartikeln, hergestellt mit 1,5 mM (1:1) Natriumacetat.

Auch dies bestätigt die Vermutung, dass die Amino- und Carboxylgruppe der Aminosäure zur Vesikelbildung benötigt werden.

### 5.2.5 *para*-Aminosalicylsäure-Lösung (PAS)

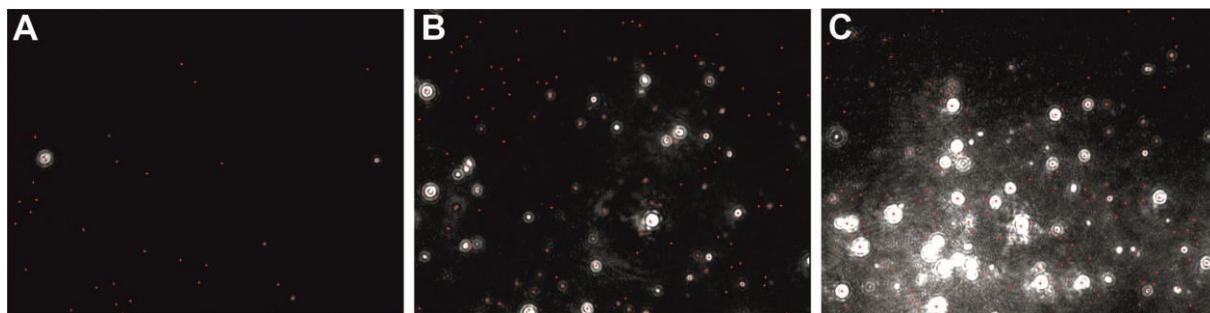
Um die Theorie, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe für die Vesikelbildung benötigt werden, weiter zu bestätigen, wurde *para*-Aminosalicylsäure verwendet. *Para*-Aminosalicylsäure hat wie die Aminosäuren eine Carboxyl- sowie eine Aminogruppe und wird als leichtes Antibiotikum verwendet.

Es wurde eine Lösung von *para*-Aminosalicylsäure hergestellt, auf pH = 9 eingestellt und durch einen 20 nm Anotopfilter filtriert. Danach wurde die Lösung mittels der NTA untersucht.



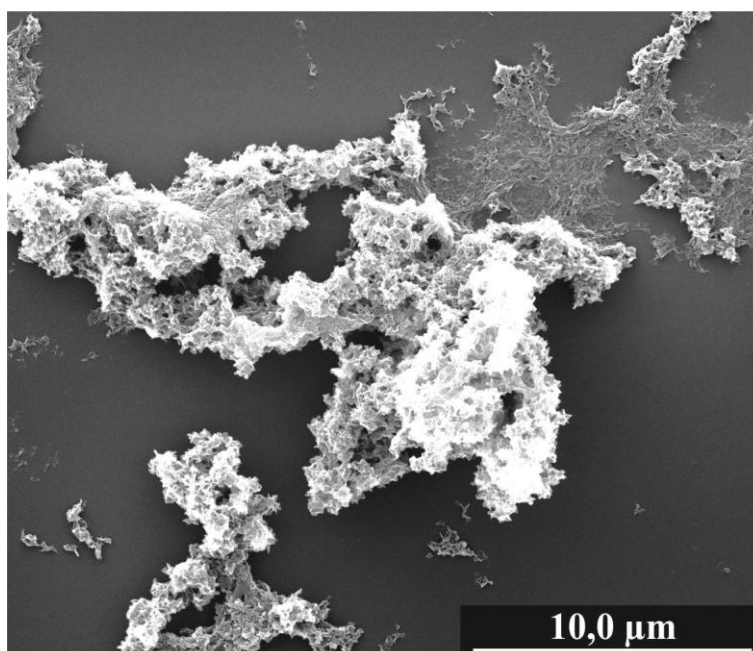
**Abbildung 105:** Zeitaufgelöste NTA einer 3mM *para*-Aminosalicylsäure-Lösung (PAS).





**Abbildung 106:** Streulicht beobachtet mittels NTA von einer 3mM *para*-Aminosalicylsäure-Lösung nach A) 30 s, B) 90 s und C) 210 s.

Während der NTA-Untersuchung konnte eine steigende Vesikelkonzentration im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Nach 30 s konnte eine Konzentration von  $1,00 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  gemessen werden, nach 90 s stieg die Konzentration auf  $8,92 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$  an. Nach 210 s war die Konzentration bei  $12,61 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Diese Beobachtung ist in **Abbildung 105** klar zu sehen. Die Streulichtbilder in **Abbildung 106** verdeutlichen diese Beobachtung. Es wurde auch versucht, Calciumphosphat-Hohlpartikel herzustellen, wie aber dem REM-Bild in **Abbildung 107** zu entnehmen ist, gelang dies nicht.



**Abbildung 107:** REM-Bild von Calciumphosphat-Nanopartikeln, hergestellt in Gegenwart von 1,5 mM (1:1) *para*-Aminosalicylsäure-Lösung.



### **5.2.6 Zusammenfassung des Kapitels: Aminosäuren in Wasser**

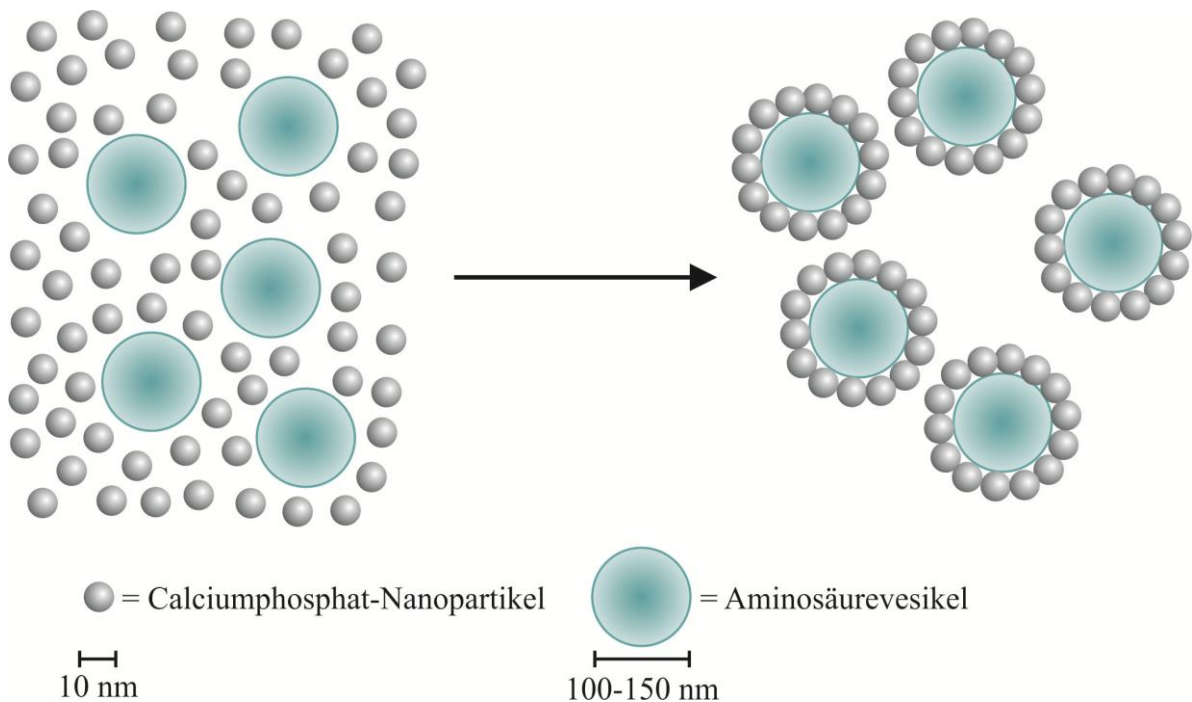
Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, können Aminosäuren und Dipeptide durch eine supramolekulare Selbstorganisation Vesikel in wässrigen Lösungen bilden. Der Durchmesser dieser Vesikel liegt zwischen 90 und 150 nm. Die Vesikel konnten nicht nur mit der *Nanoparticle Tracking Analysis* beobachtet werden, sondern auch mit der Rasterkraftmikroskopie. Mittels Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie konnten selbstorganisierte Aminosäureaggregate mit bis zu 7 Aminosäuremolekülen nachgewiesen werden. Die Vesikelbildung ist unabhängig von der Aminosäurekonzentration sowie der Temperatur. Es ist jedoch eine pH-Wert-Abhängigkeit zu sehen, da sich die Vesikel erst mit steigendem pH-Wert bilden. Um genauere Informationen der Vesikelbildung zu erhalten, wurden auch Boc-Alanin, Harnstoff, Natriumacetat und *para*-Aminosalicylsäure verwendet.

Aus diesen Analysen kann gefolgert werden, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe benötigt werden. Weiter kann aus den Daten der Kernresonanzspektroskopie und Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie gefolgert werden, dass es sich um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Aminosäuremolekülen handelt. Diese Wechselwirkung kann zwischen den Aminosäuremolekülen durch den zwitterionischen Charakter der Aminosäuren ausgebildet werden.

In der Literatur wurden bisher noch keine Vesikel durch eine supramolekulare Selbstorganisation von Aminosäuren beschrieben. Es wurde bis dato nur die Selbstorganisation von Peptiden, Proteinen und anderen Stoffen, wie zum Beispiel ZnO, gezeigt.<sup>[64, 125-130]</sup>

### **5.3 Modell eines Bildungsmechanismus zur Bildung von Calciumphosphat-Hohlpartikeln**

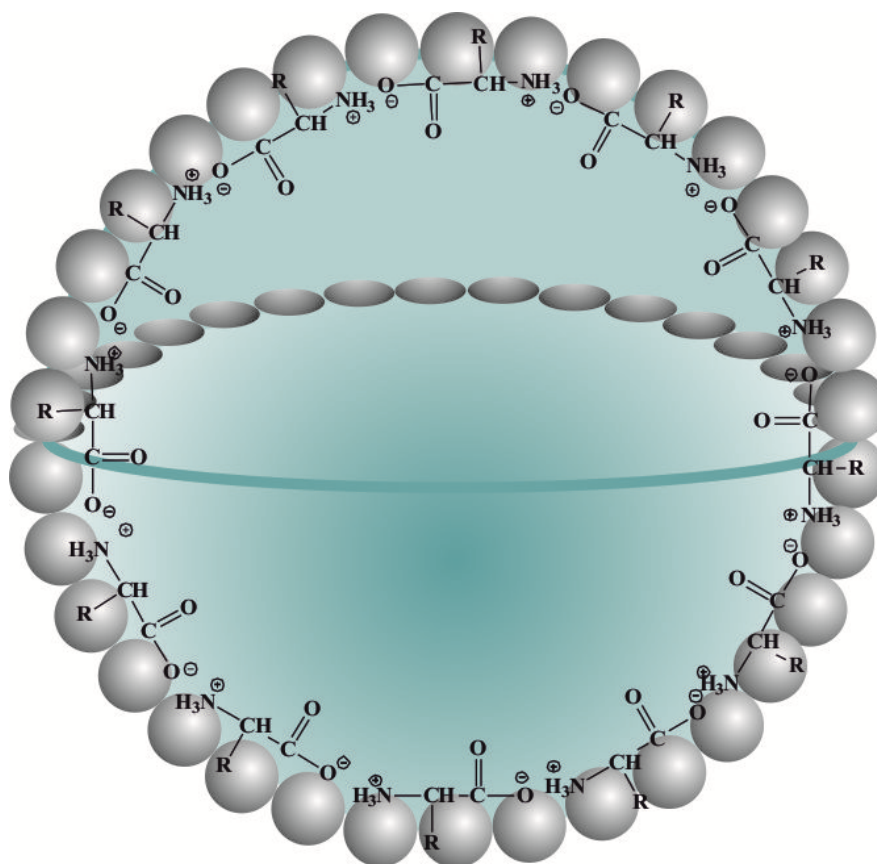
In Kapitel 5.1 wurde gezeigt, dass sich in Gegenwart von Aminosäuren oder Dipeptiden Calciumphosphat-Hohlpartikel durch eine spontane Selbstorganisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln bilden. In Kapitel 5.2 wurde gezeigt, dass Aminosäuren oder Dipeptide aufgrund einer supramolekularen Selbstorganisation Vesikel bilden. Diese Vesikel dienen nun als Aminosäuretemplat für die Bildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel. Dazu lagern sich die kleinen Calciumphosphat-Nanopartikel um das aus Aminosäuren oder Dipeptiden bestehende Vesikel an, was in dem Modell in **Abbildung 108** grafisch gezeigt ist.



**Abbildung 108:** Erster Schritt eines möglichen Bildungsmechanismus der Calciumphosphat-Hohlpartikel.

Da schon nach 25 s erste Hohlpartikel beobachtet werden konnten, ist die Anlagerung der Calciumphosphat-Nanopartikel an die Aminosäurevesikel ein sehr schneller Vorgang.

In **Abbildung 109** ist vergrößert ein Schnitt durch ein Calciumphosphat-Hohlpartikel gezeigt. Die Selbstorganisation der Aminosäuren und Dipeptide findet über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuremolekülen statt. Die Wechselwirkung kann nur aufgrund der zwitterionischen Eigenschaften der Aminosäuren oder Dipeptide zustande kommen. Diese mögliche Wechselwirkung ist in **Abbildung 109** gezeigt. Das Templat in Form eines Aminosäurevesikels oder Dipeptidvesikels ist türkis dargestellt. Die grauen Partikel stellen die kleinen ca. 10 nm großen primären Calciumphosphat-Nanopartikel dar. Diese Nanopartikel lagern sich wie oben beschrieben an das Templat an und bilden so die Hohlpartikel aus. Die Innenseite bzw. die Füllung des Hohlpartikels besteht aus dem Vesikel, welches wiederum mit Wasser gefüllt ist. GANESAN<sup>[14]</sup> zeigte in seiner Arbeit das der Aminosäuregehalt in den Hohlpartikeln bei ca. 2,2 % liegt, was mit diesem Modell im Einklang ist.

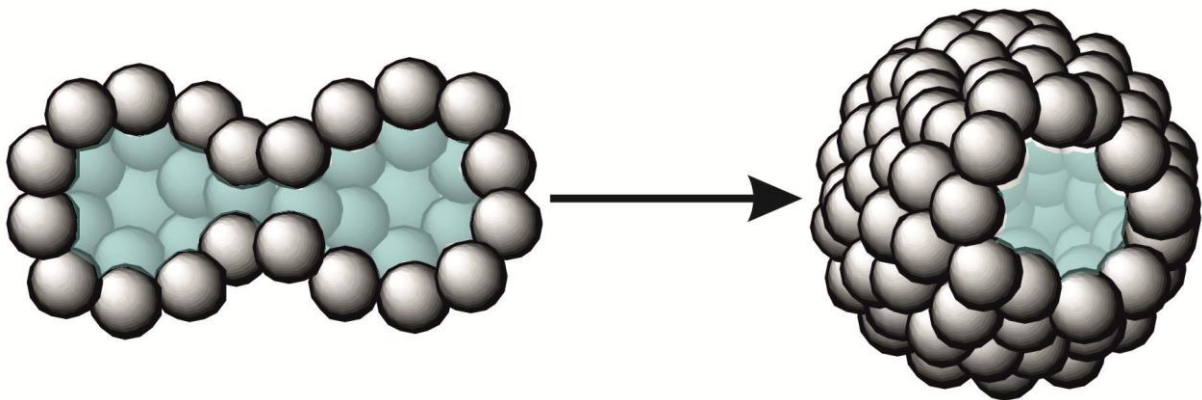


**Abbildung 109:** Schnitt durch ein Modell eines Calciumphosphat-Hohlpartikels mit einem Aminosäure- oder Dipeptidvesikel als Templat.

---

---

Ein weiterer möglicher Schritt in der Ausbildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel ist die Fusion zweier kleinerer zu einem größeren Hohlpartikel. Diese Fusion wurde in einigen kryo-transmissionselektronenmikroskopischen Bildern und rasterelektronenmikroskopischen Bildern beobachtet. Das Modell der Fusion von Hohlpartikeln zu einem größeren Hohlpartikel ist in **Abbildung 110** grafisch dargestellt.



**Abbildung 110:** Fusion von zwei Calciumphosphat-Hohlpartikeln zu einem größeren Calciumphosphat-Hohlpartikel.

Die Fusion kann wie das Zusammenwachsen von zwei Seifenblasen oder zwei Öltropfen zu einer größeren Blase bzw. einem größeren Tropfen gesehen werden. Aus dieser Beobachtung kann man schließen, dass es sich bei den Calciumphosphat-Hohlpartikeln nicht um eine starre, sondern vielmehr um eine flexible Hülle handelt.

In der Literatur werden für die Bildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel diverse Vorschläge gemacht.<sup>[56, 59, 62, 115, 116, 125, 126]</sup> Ein möglicher Bildungsmechanismus ist die Wechselwirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit einer Carboxylgruppe als erster Schritt. Anschließend kondensieren die Phosphationen durch elektrostatische Wechselwirkungen an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.<sup>[56]</sup> Ein weiterer beschriebener Bildungsmechanismus ist die Anlagerung von Calciumphosphat an die negativ geladene Oberfläche von Liposomen.<sup>[115]</sup>

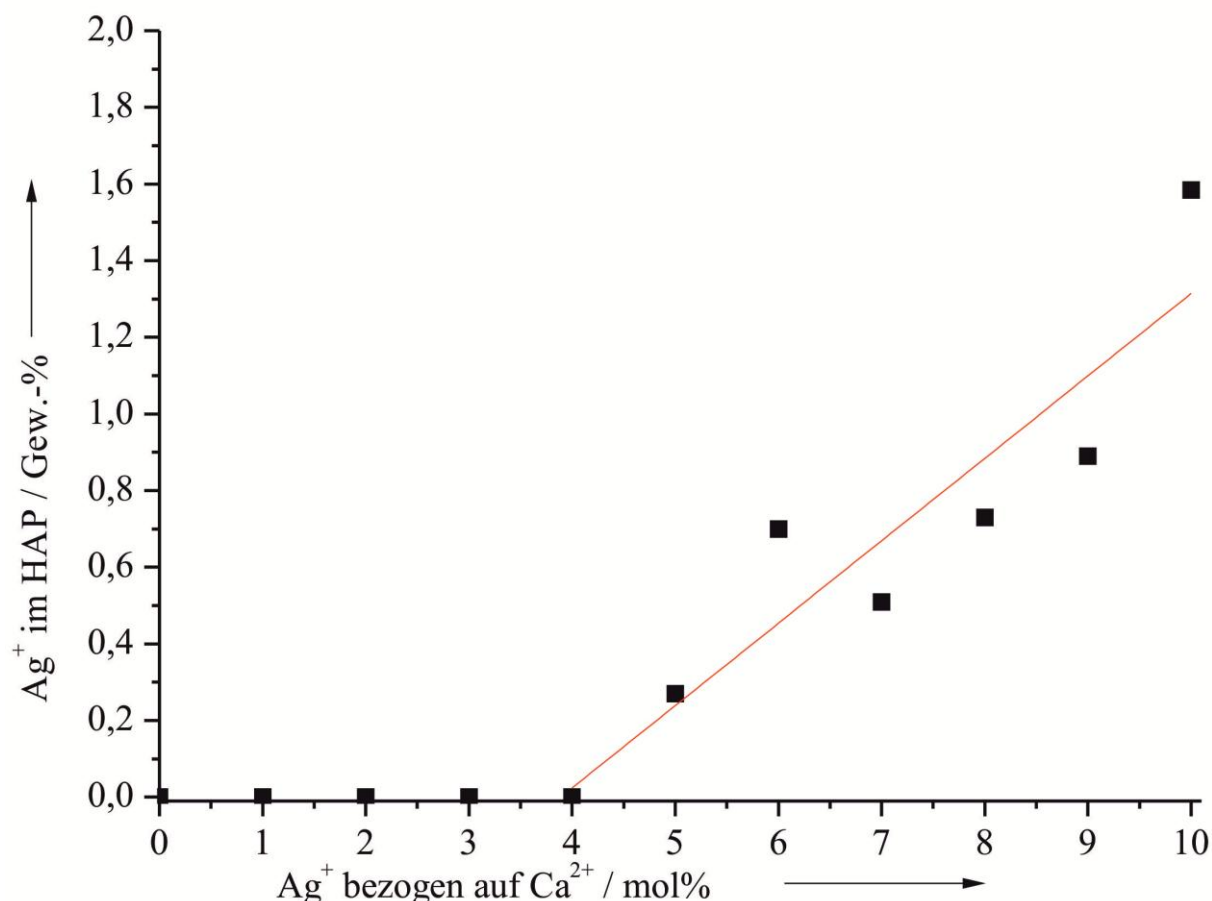
Diese Ergebnisse stimmen mit dem in dieser Arbeit beobachteten Ergebnis und vorgeschlagenen Mechanismus überein. Bisher wurde jedoch noch kein Mechanismus aus niedermolekularen Aminosäuren oder Dipeptiden als Templat in der Literatur beschrieben. Hinzu kommt, dass die verwendeten Aminosäuren und Dipeptide nicht grenzflächenaktiv sind.

## 5.4 Silber-dotierter Hydroxylapatit

Der Silber-dotierte Hydroxylapatit (HAP) wurde wie in Kapitel 4.4 beschrieben hergestellt. Das Ca/P-Verhältnis liegt zwischen 1,51 und 1,60. Das (Ca+Ag)/P-Verhältnis liegt zwischen 1,54 und 1,60. Die Ca/P- bzw. die (Ca+Ag)/P-Verhältnisse entsprechen dem von calciumdefizitärem Hydroxylapatit (CDHA). Bei einer Einwaage von 1 bis 4 mol% Silber wird kein Silber in das HAP-Kristallgitter eingebaut. Ab 5 mol% Silber werden Silberionen in das Kristallgitter eingebaut. Bei einer Einwaage von 10 mol% Silber werden zwischen 1,3 und 1,8 Gew.-% Silber in das HAP-Kristallgitter eingebaut. Die in der Literatur angegebenen Werte für Silber stimmen mit den erhaltenen Werten überein, oder liegen über den erhaltenen Silberwerten.<sup>[38-40, 81]</sup> In **Tabelle 13** sind alle elementaranalytischen Daten gezeigt. Der Silber- und Calciumgehalt wurde mittels AAS bestimmt, der Phosphatgehalt wurde photometrisch bestimmt.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung der Silber-dotierten Hydroxylapatitproben.

$\text{Ag}^+$ eingewogen / mol-%	$\text{Ca}^{2+}$ / Gew.-%	$\text{PO}_4^{3-}$ / Gew.-%	$\text{Ag}^+$ / Gew.-%	Ca / P- Verhältnis	Ca+Ag / P- Verhältnis
0	33,53	54,50	0,00	1,54	1,54
1	33,92	51,55	0,00	1,56	1,56
2	34,17	52,60	0,00	1,54	1,54
3	33,96	52,45	0,00	1,53	1,53
4	33,00	50,50	0,00	1,55	1,55
5	34,23	50,73	0,27	1,60	1,60
6	34,19	51,50	0,70	1,57	1,59
7	32,81	49,35	0,51	1,58	1,58
8	33,47	51,35	0,73	1,54	1,56
9	33,04	49,35	0,89	1,59	1,60
10	35,28	55,60	1,27	1,52	1,54
10	32,52	51,20	1,78	1,51	1,54



**Abbildung 111:** Grafische Darstellung des prozentualen Einbaus von Silberionen in das HAP-Kristallgitter, bezogen auf die Einwaage (mol%).

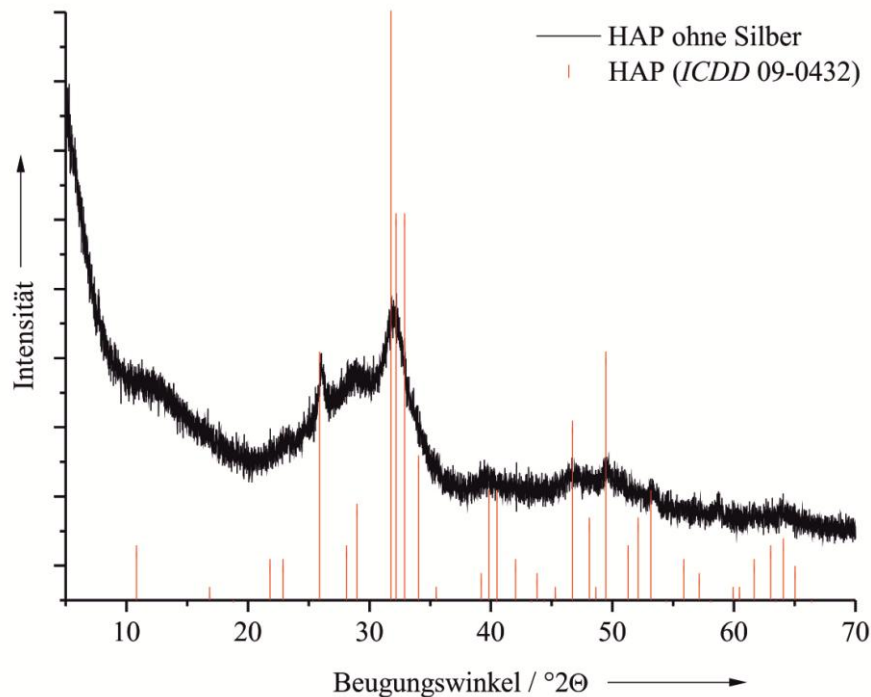
Wie aus der grafischen Darstellung in **Abbildung 111** zu erkennen ist, verläuft der Silbereinbau in das HAP-Kristallgitter ab 5 mol % Silber linear. Für das Einbringen von Silberionen in das Hydroxylapatit-Kristallgitter wird ein großer Überschuss von Silber benötigt, was auf das kontinuierliche Syntheseverfahren durch kurze Reaktionszeiten zurückgeführt werden kann. Ein weiterer Grund ist die Ausbildung eines löslichen Silberdiamminkomplexes, was auch erklären würde, warum Silberionen erst ab 5 mol% in das Kristallgitter eingebaut werden. Die mittlere Verweilzeit der Lösung im Reaktionsgefäß beträgt nach Gleichung (1), bei einer Zuflussgeschwindigkeit von  $50 \text{ mL min}^{-1}$  und einem Volumen von 40 mL des Reaktionsgefäßes 75 Sekunden.



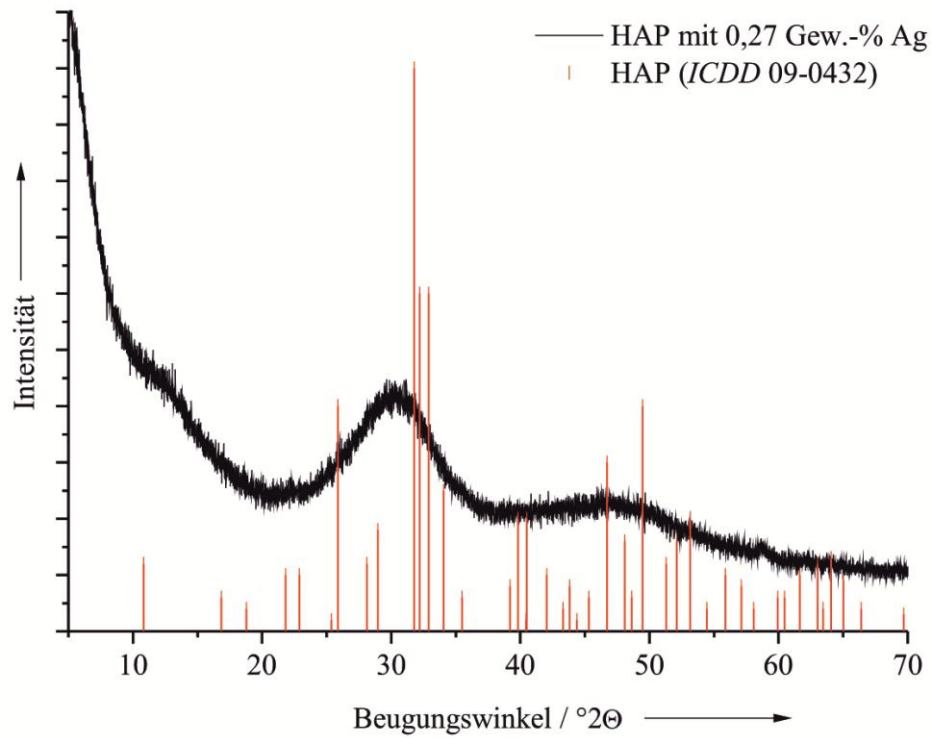
In den Pulverdiffraktogrammen der Proben ist erst eine Kristallinitätsabnahme und anschließend eine Steigerung der Kristallinität zu beobachten. Die Proben mit 0,27 Gew.-% und 0,88 Gew.-% haben einen amorphen Charakter, die Probe mit 1,70 Gew.-% hat hingegen einen nanokristallinen Charakter. Bei den Proben sind keine Reflexe des Silberphosphats zu erkennen. In der Literatur werden bei diesen Silberanteilen keine Reflexe von Silberphosphat beschrieben, sondern erst ab einem Silbergehalt von über 3 Gew.-% Silber im HAP beobachtet.<sup>[15-17, 38, 40, 81, 131]</sup> Die Pulverdiffraktogramme sind in **Abbildung 112** bis **Abbildung 115** dargestellt. Für den reinen HAP und für den Silber-dotierten HAP wurden die Gitterparameter (**Tabelle 14**) sowie das Volumen bestimmt. Aufgrund der Peakbreite ist nur eine grobe Näherung möglich.

**Tabelle 14:** Berechnete Gitterparameter

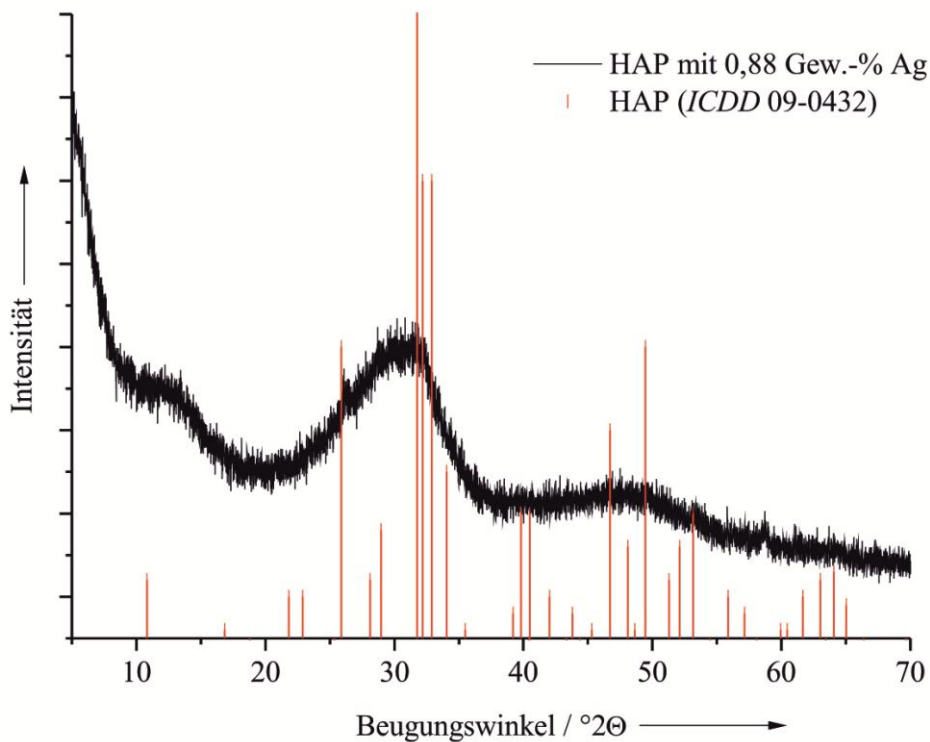
Probe	Gitterparameter / Å	Volumen / Å <sup>3</sup>
0 Gew.-% Ag im HAP	$a = 9,43; c = 6,88$ (hexagonal)	$529,8 \pm 0,6$
1,57 Gew.-% Ag im HAP	$a = 9,45; c = 6,88$ (hexagonal)	$532,2 \pm 0,4$



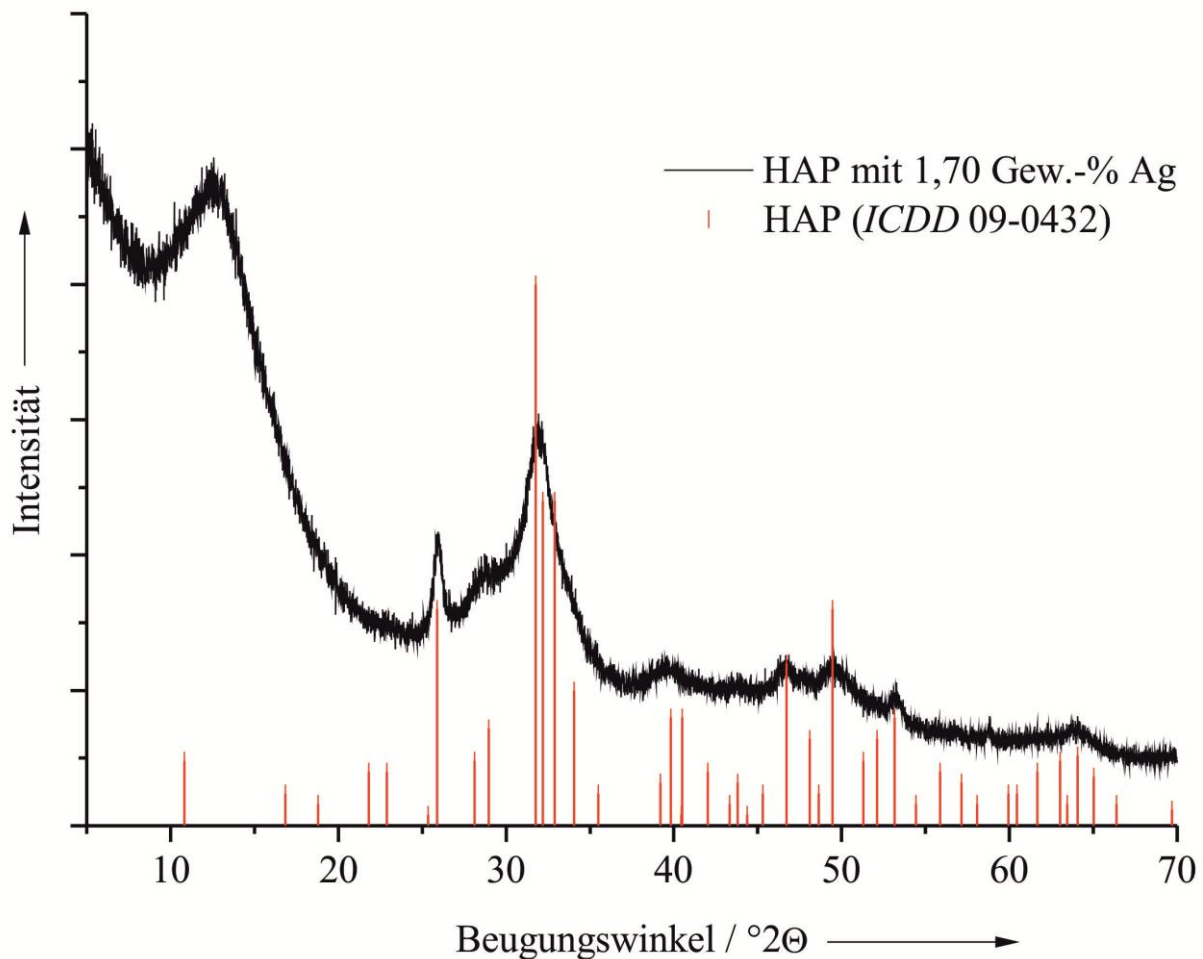
**Abbildung 112:** Pulverdiffraktogramm von reinem Hydroxylapatit ohne Silberanteil, die Reflexpositionen wurden der *ICDD* entnommen.



**Abbildung 113:** Pulverdiffraktogramm von Hydroxylapatit mit 0,27 Gew.-% Silber, die Reflexpositionen sind der *ICDD* entnommen.

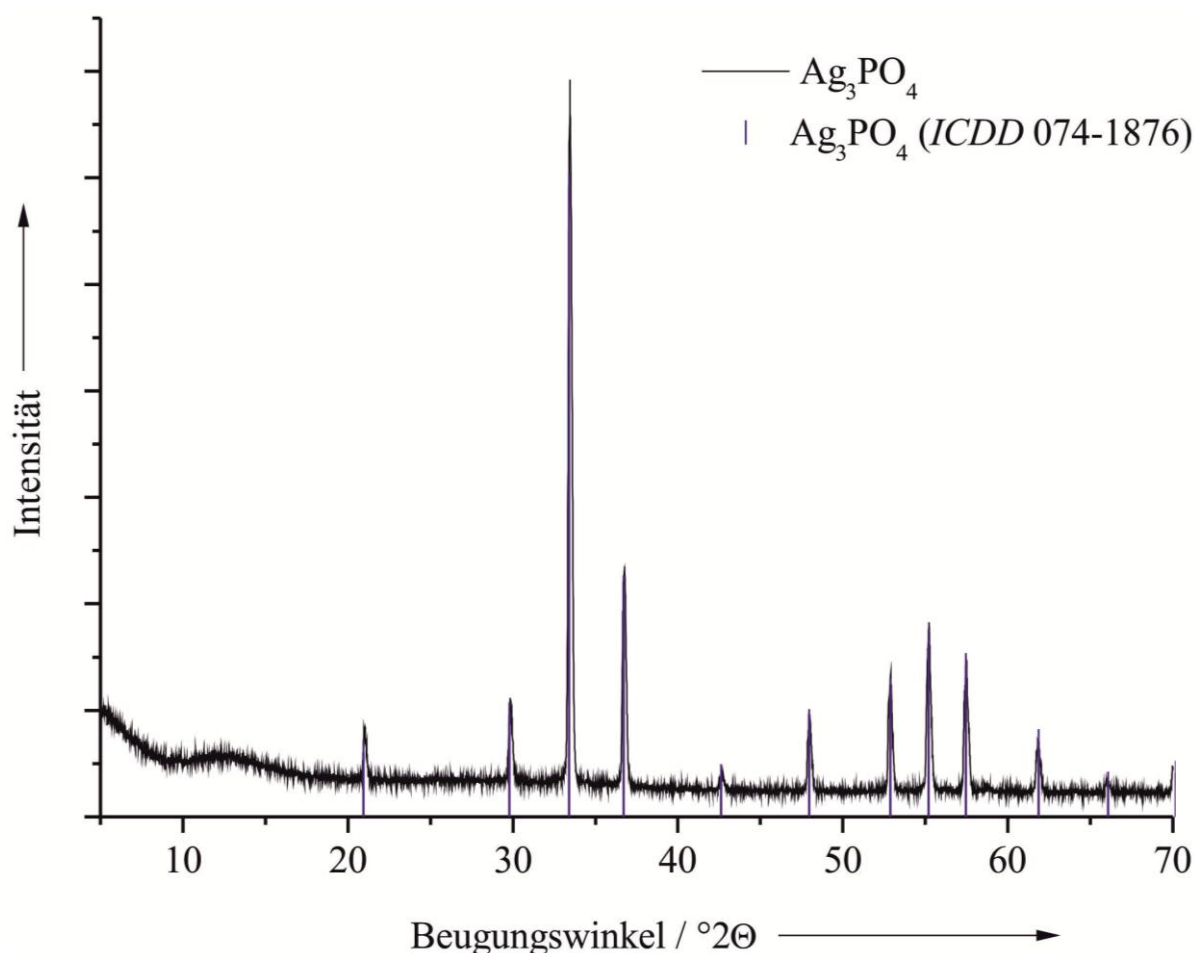


**Abbildung 114:** Pulverdiffraktogramm von Hydroxylapatit mit 0,88 Gew.-% Silber, die Reflexpositionen sind der *ICDD* entnommen.



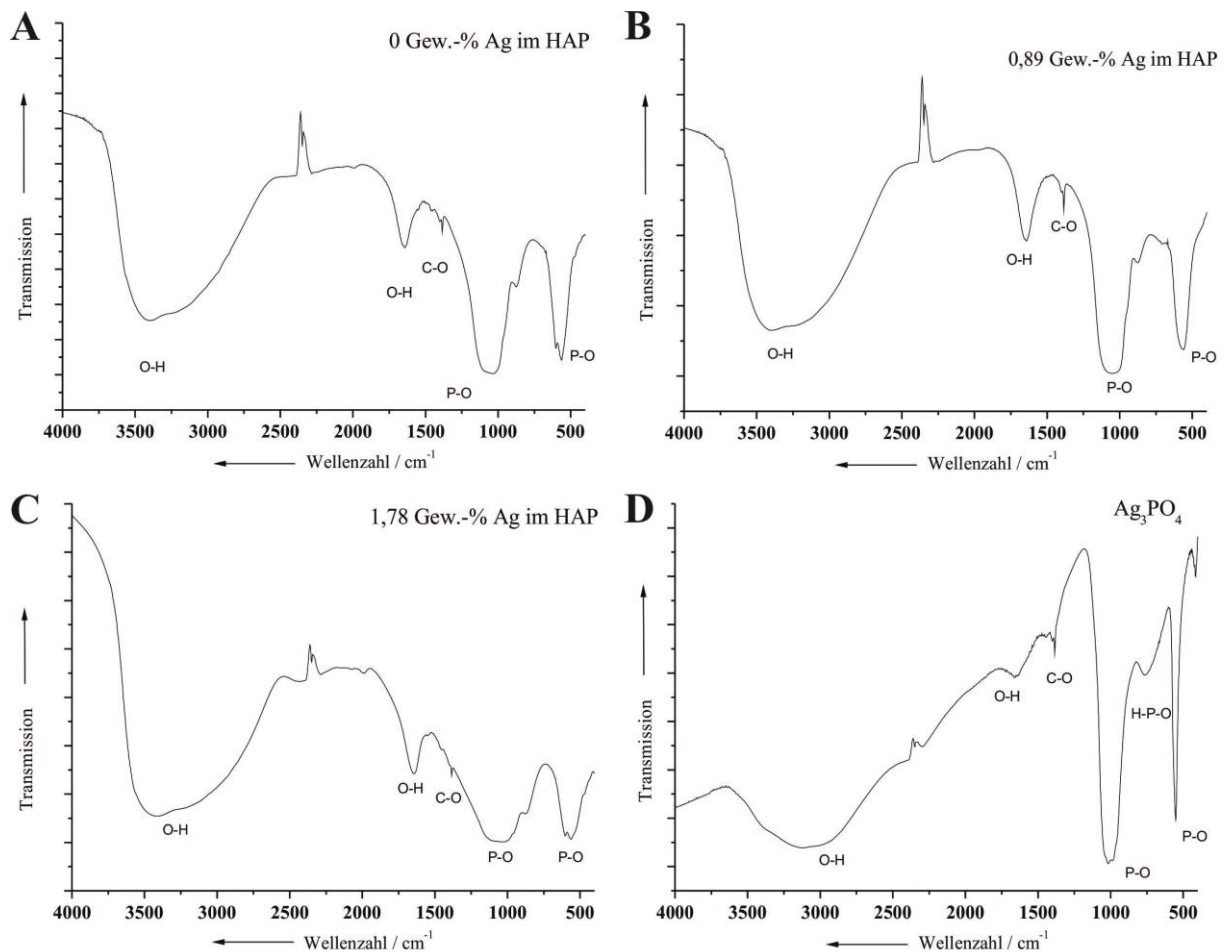
**Abbildung 115:** Pulverdiffraktogramm von Hydroxylapatit mit 1,70 Gew.-% Silber, die Reflexpositionen sind der ICDD entnommen.

Unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 4.4 beschrieben wurde auch Silberphosphat hergestellt. Der Silbergehalt in dieser Probe liegt bei 78,62 Gew.-% und der Phosphatgehalt bei 21,35 Gew.-%, was den theoretischen Werten entspricht. In **Abbildung 116** ist das gemessene Pulverdiffraktogramm von Silberphosphat gezeigt. Das Diffraktogramm zeigt, dass das Silberphosphat im Gegensatz zu den Silber-HAP-Proben hochkristallin vorliegt. Das Diffraktogramm stimmt mit dem in der Literatur<sup>[132]</sup> gezeigten überein. Die Gitterparameter ergeben ein kubisches System mit  $a = 6,014 \text{ \AA}$ .



**Abbildung 116:** Pulverdiffraktogramm von Silberphosphat. Die Reflexpositionen sind der ICDD entnommen.

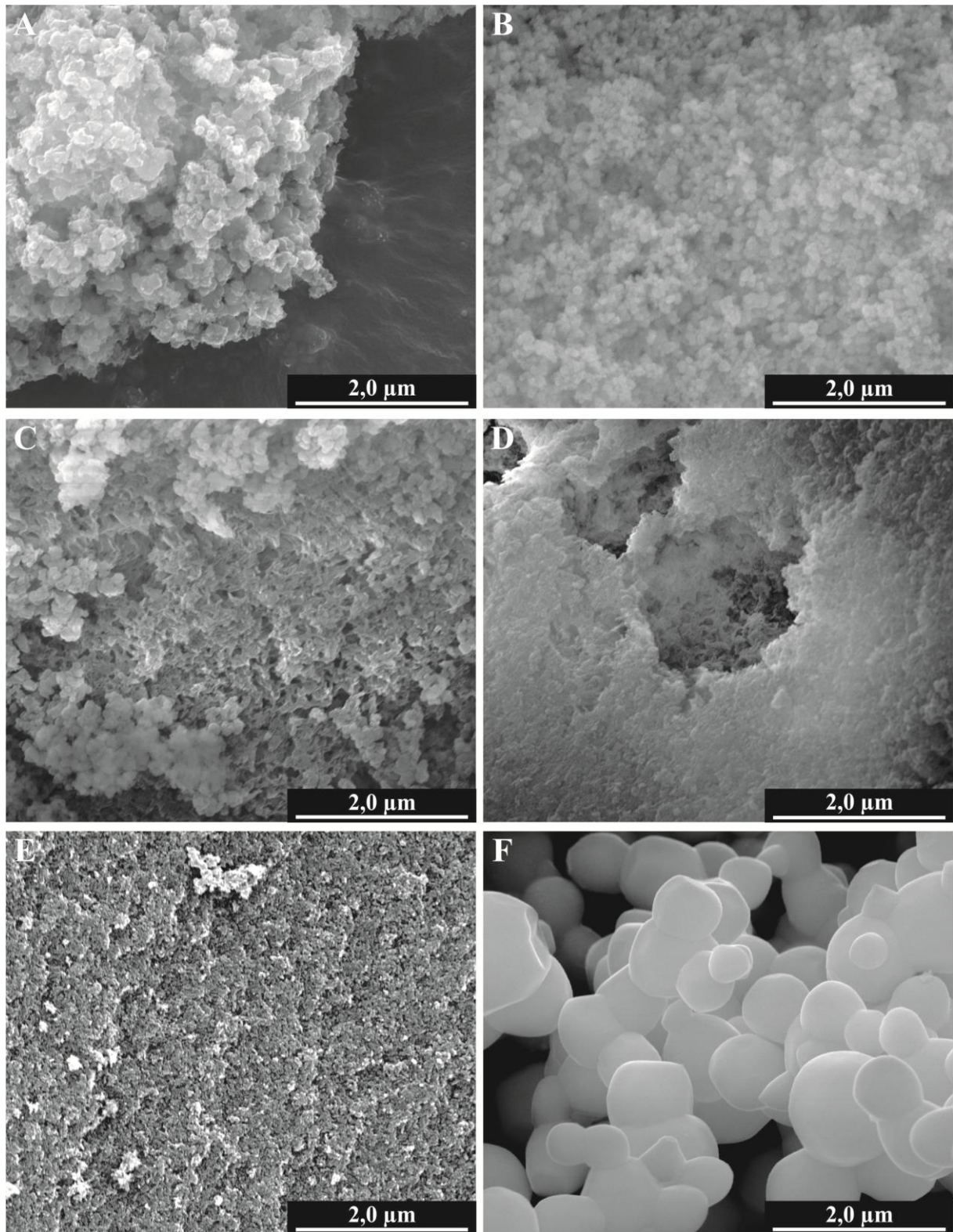
Aus den IR-Spektren sind die zu erwartenden Banden bei ca.  $3400\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{H}_2\text{O}$ , bei ca.  $1625\text{ cm}^{-1}$  für die OH-Valenzschwingung, bei  $1385\text{ cm}^{-1}$  für die CO-Valenzschwingung und bei ca.  $1040$  u.  $560\text{ cm}^{-1}$  für die PO-Schwingungen abzulesen. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur<sup>[1, 2, 40, 68, 81]</sup> angegebenen Werten überein. In **Abbildung 117 D** ist das IR-Spektrum von  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  gezeigt. Es sind die Banden für Phosphat zu sehen. Das IR-Spektrum von Silberphosphat stimmt mit dem in der Literatur<sup>[132]</sup> gezeigten Spektrum überein. Die OH-Banden sind nicht so stark ausgeprägt wie bei den HAP-Proben.



**Abbildung 117:** IR-Spektren von Hydroxylapatit mit unterschiedlichen Silberanteilen (A-C) und von Silberphosphat (D).

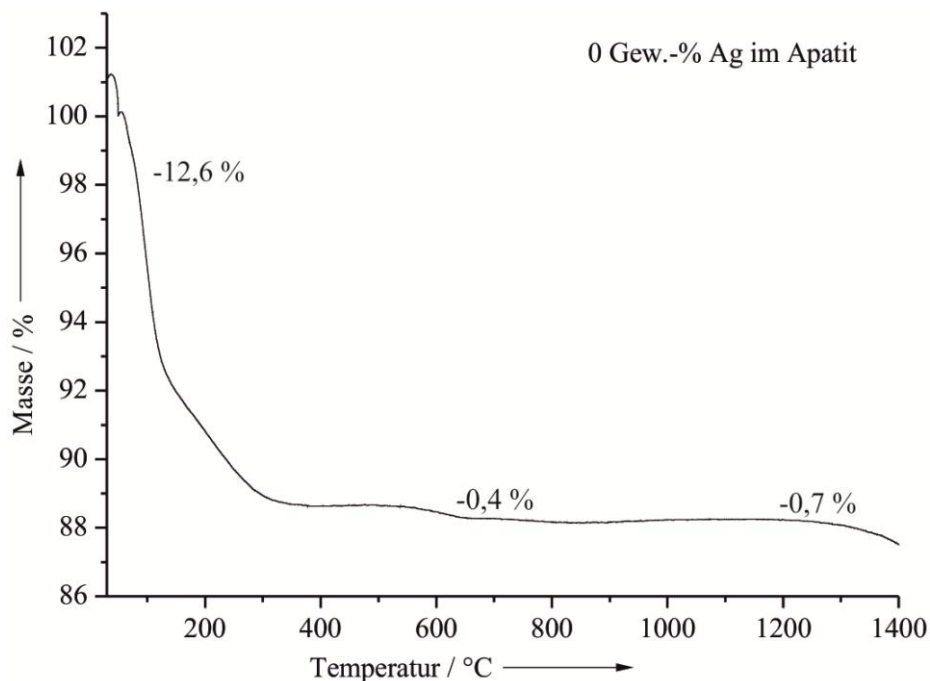
In den rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen ist die Steigerung der Kristallinität der Proben sehr gut zu sehen. Während in **Abbildung 118 A** (HAP) und **B** (HAP mit 0,27 Gew.-% Ag) nur sphärische Partikel zu sehen sind, ist in **Abbildung 118 C** (HAP mit 0,51 Gew.-% Ag) bereits ein Gemisch aus sphärischen und nadelförmigen Partikeln zu sehen. Bei den in **Abbildung 118 D** und **E** gezeigten Partikeln liegt der Silbergehalt bei 1,57 und 1,78 Gew.-%. In diesen Bildern sind nur noch nadelförmige Partikel zu sehen. In **Abbildung 118 F** ist ein rasterelektronenmikroskopisches Bild von Silberphosphat gezeigt. Hier ist der Unterschied zwischen Silberphosphat und Silber-dotiertem Hydroxylapatit sehr gut zu sehen.



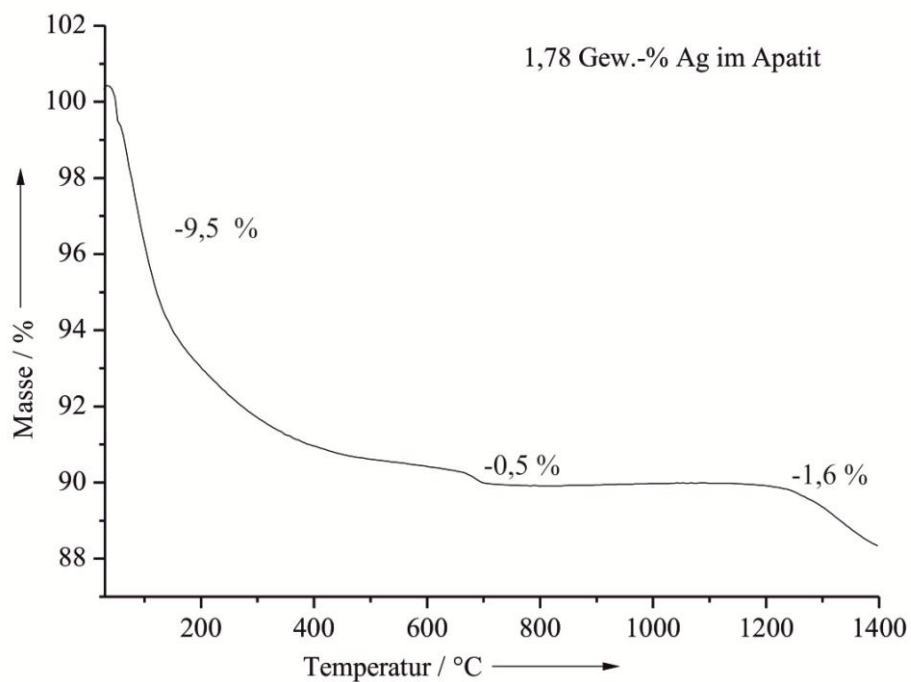


**Abbildung 118:** Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen von A) HAP , B) HAP mit 0,27 Gew.-% Ag, C) HAP mit 0,51 Gew.-% Ag, D) HAP mit 1,57 Gew.-% Ag, E) HAP mit 1,78 Gew.-% Ag und F) von Silberphosphat.

Mit den TG-Messungen wurden der Wasser- (100-400 °C) und Carbonatgehalt (ca. 600 °C) der Proben bestimmt. Die Thermogramme sind in **Abbildung 119** und **Abbildung 120** gezeigt.



**Abbildung 119:** Thermogramm von Hydroxylapatit mit 0 Gew.-% Silber.



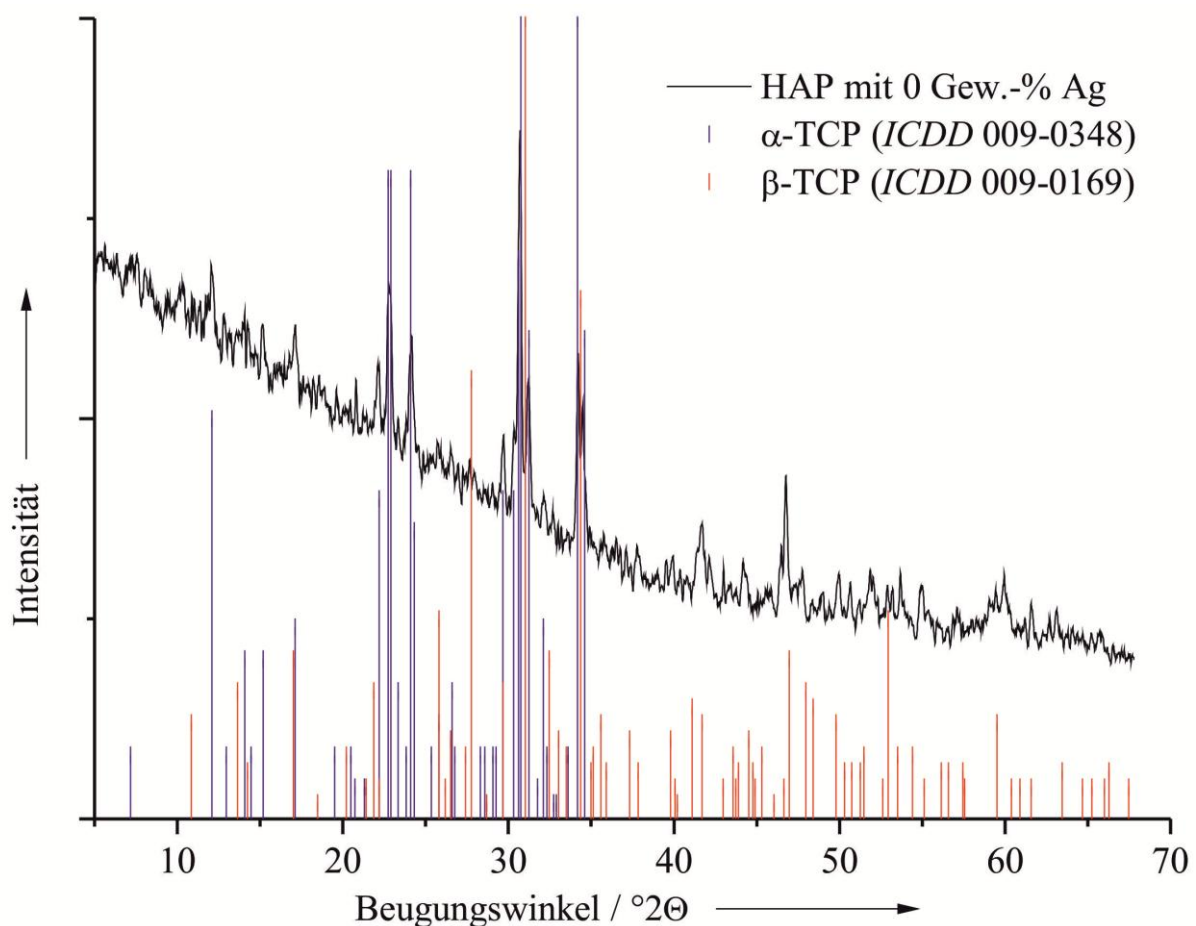
**Abbildung 120:** Thermogramm von Hydroxylapatit mit 1,78 Gew.-% Silber.



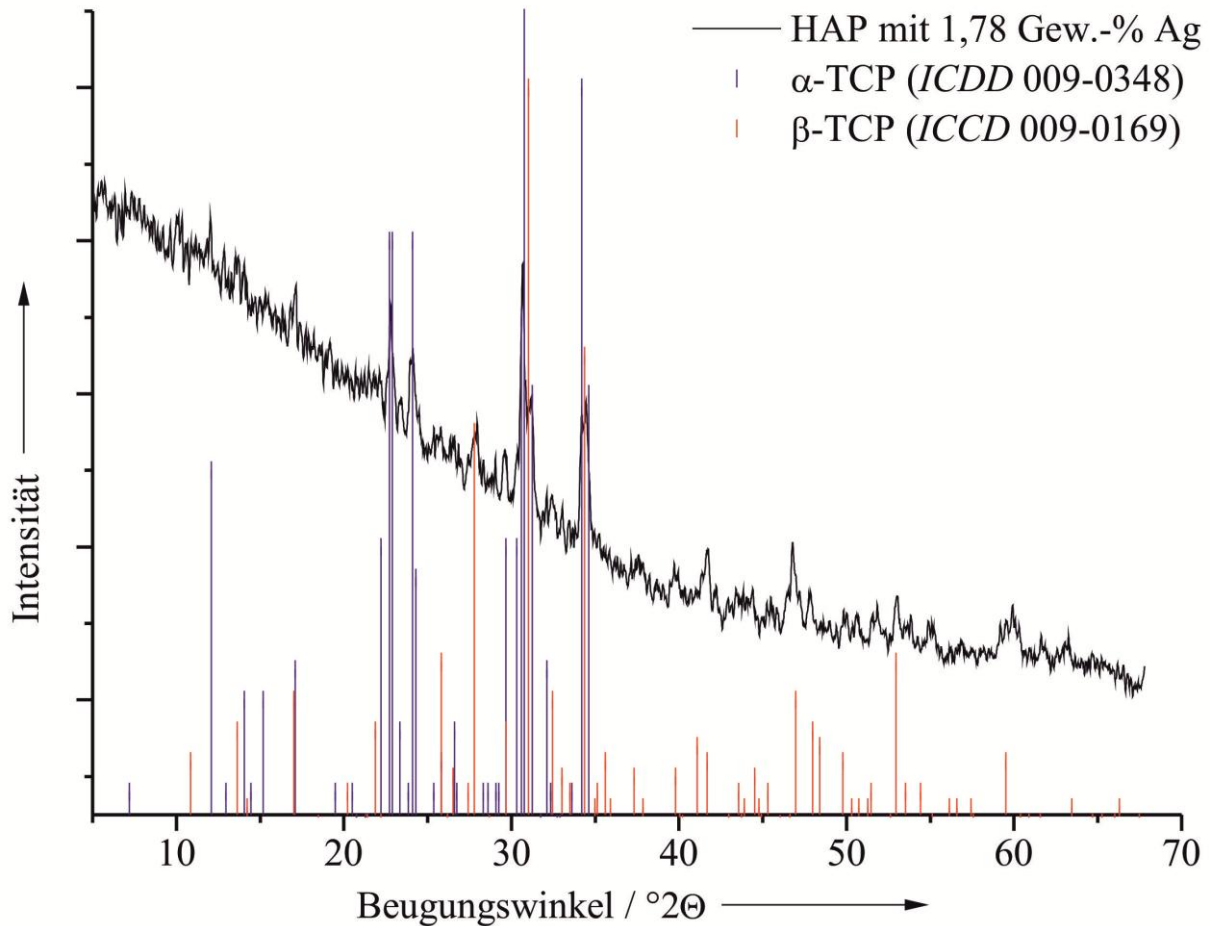
Der Wassergehalt der Proben beträgt  $12,6 \% \pm 0,1 \%$  für den reinen HAP und  $9,5 \% \pm 0,1 \%$  für den HAP mit 1,78 Gew.-% Silber. Der Carbonatgehalt wird mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{w(\text{CO}_2)}{M(\text{CO}_2)} \cdot M(\text{CO}_3^{2-}) = w(\text{CO}_3^{2-}) \quad (12)$$

Aus der Berechnung mit der Gleichung (12) ergibt sich ein Carbonatgehalt von  $0,5 \% \pm 0,1 \%$  für den reinen HAP und  $0,7 \% \pm 0,1 \%$  für den HAP mit 1,78 Gew.-% Silber. Das Carbonat in den HAP-Proben ist auf  $\text{CO}_2$  aus der Luft und auf gelöstes  $\text{CO}_2$  im Wasser zurückzuführen. Oberhalb von  $1300^\circ\text{C}$  zersetzt sich Hydroxylapatit.



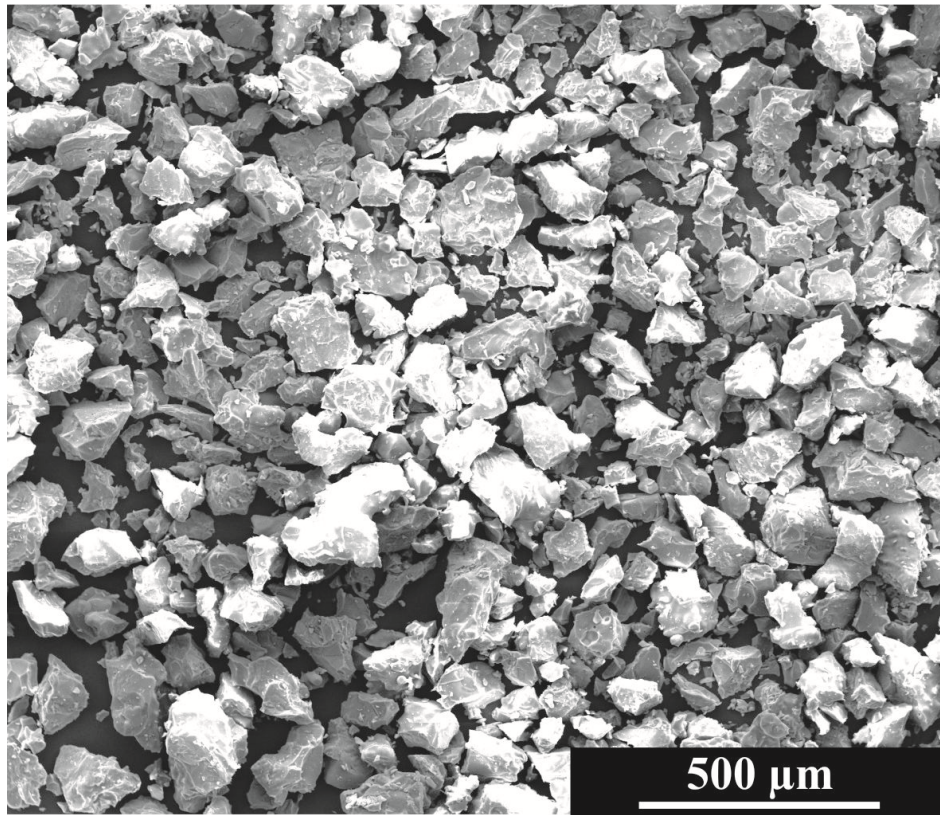
**Abbildung 121:** Pulverdiffraktogramm von Hydroxylapatit nach der Thermogravimetrie bis  $1400^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 122:** Pulverdiffraktogramm von Hydroxylapatit mit 1,78 Gew.-% Ag nach der Thermogravimetrie bis 1400 °C.

Bei über 800 °C wandelt sich calciumdefizitärer Hydroxylapatit (CDHA) in  $\beta$ -TCP und HAP um. Zwischen 1250 °C und 1300 °C wandelt sich  $\beta$ -TCP in die Hochtemperaturphase  $\alpha$ -TCP um. Durch das Tempern in der Thermowaage hat auch eine Kristallinitätserhöhung stattgefunden. In den Pulverdiffraktogrammen der getemperten Proben in **Abbildung 121** und **Abbildung 122** ist ein Gemisch aus  $\alpha$ -TCP und  $\beta$ -TCP zu sehen, was auf eine nicht vollständige Phasenumwandlung zurückzuführen ist. Diese nicht vollständige Phasenumwandlung kann an der relativ kurzen Zeit von 100 min oberhalb von 1300 °C liegen. Bei einer längeren Temperzeit oberhalb von 1300 °C findet eine vollständige Phasenumwandlung statt.<sup>[1, 2, 68]</sup> In **Abbildung 123** ist

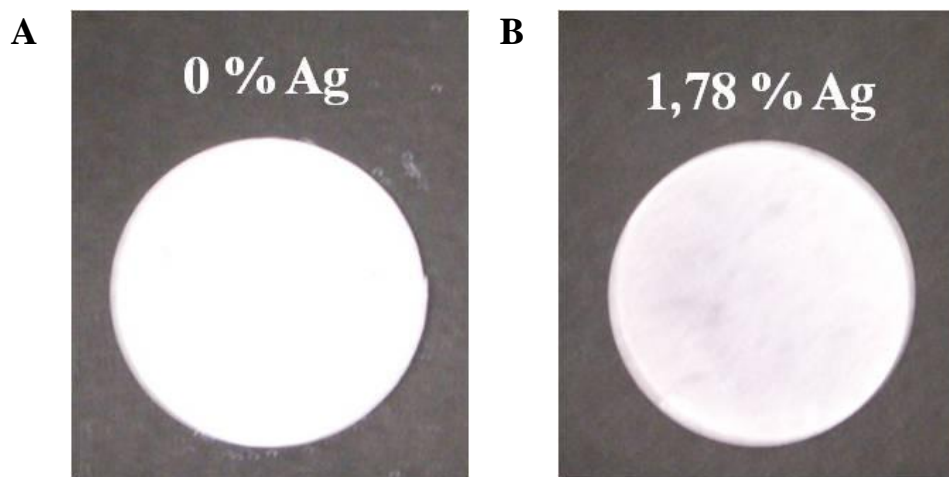
die Änderung der Morphologie im Vergleich zu **Abbildung 118E** deutlich zu erkennen.



**Abbildung 123:** REM-Bild von Hydroxylapatit mit 1,78 Gew.-% Silber nach der Thermogravimetrie auf 1400 °C.

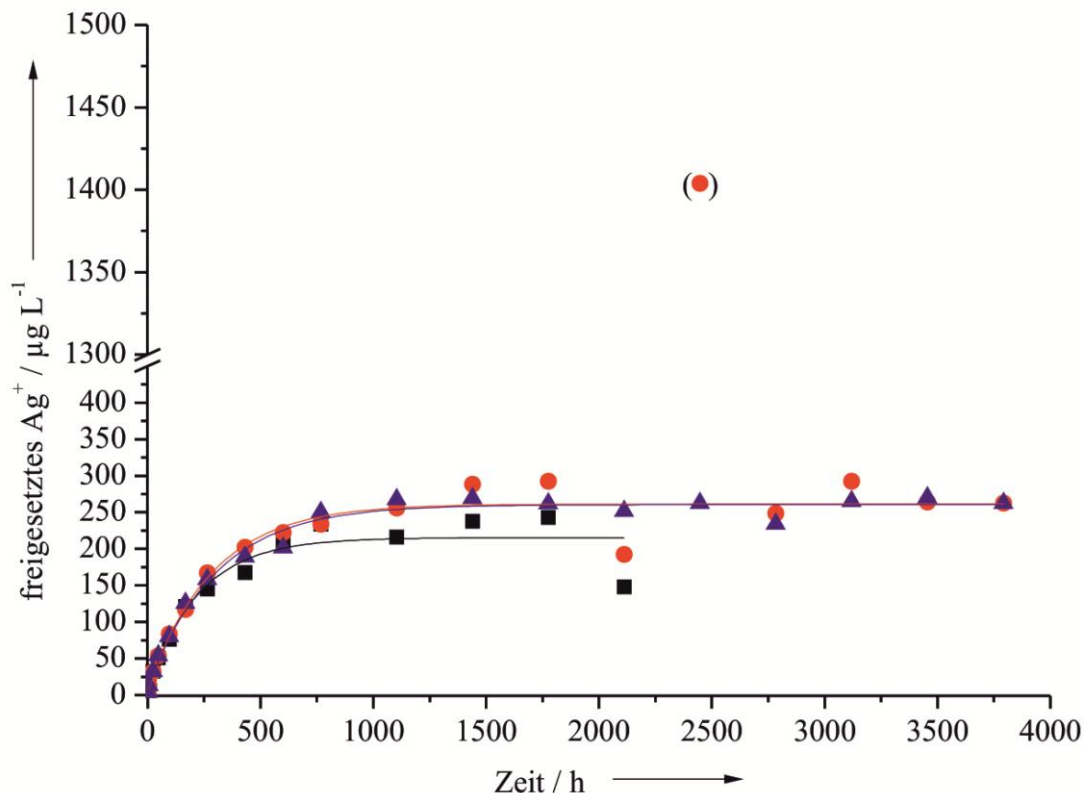
#### 5.4.1 Freisetzung von Silber aus dem Silber-dotierten Hydroxylapatit

Die Silberfreisetzung aus den Silber-dotierten Hydroxylapatit-Proben wurde mit Hilfe der Dialyse durchgeführt, um mechanische Beanspruchungen der Presslinge zu vermeiden. Aus der Arbeit von KITTLER ist bekannt, dass der verwendete Dialyseschlauch sehr gut permeabel für  $\text{Ag}^+$ -Ionen ist.<sup>[133]</sup> Die Dialysen wurden wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben durchgeführt, dabei wurde gegen das 100-fache Volumen dialysiert. In **Abbildung 124** sind zwei Beispiele für die verwendeten Presslinge gezeigt. Das jeweils abgenommene Probenvolumen lag bei 10 mL, und es wurden insgesamt 19 Proben genommen. Der Zeitraum zwischen den Probeentnahmen lag zwischen 2 h und 14 Tagen.



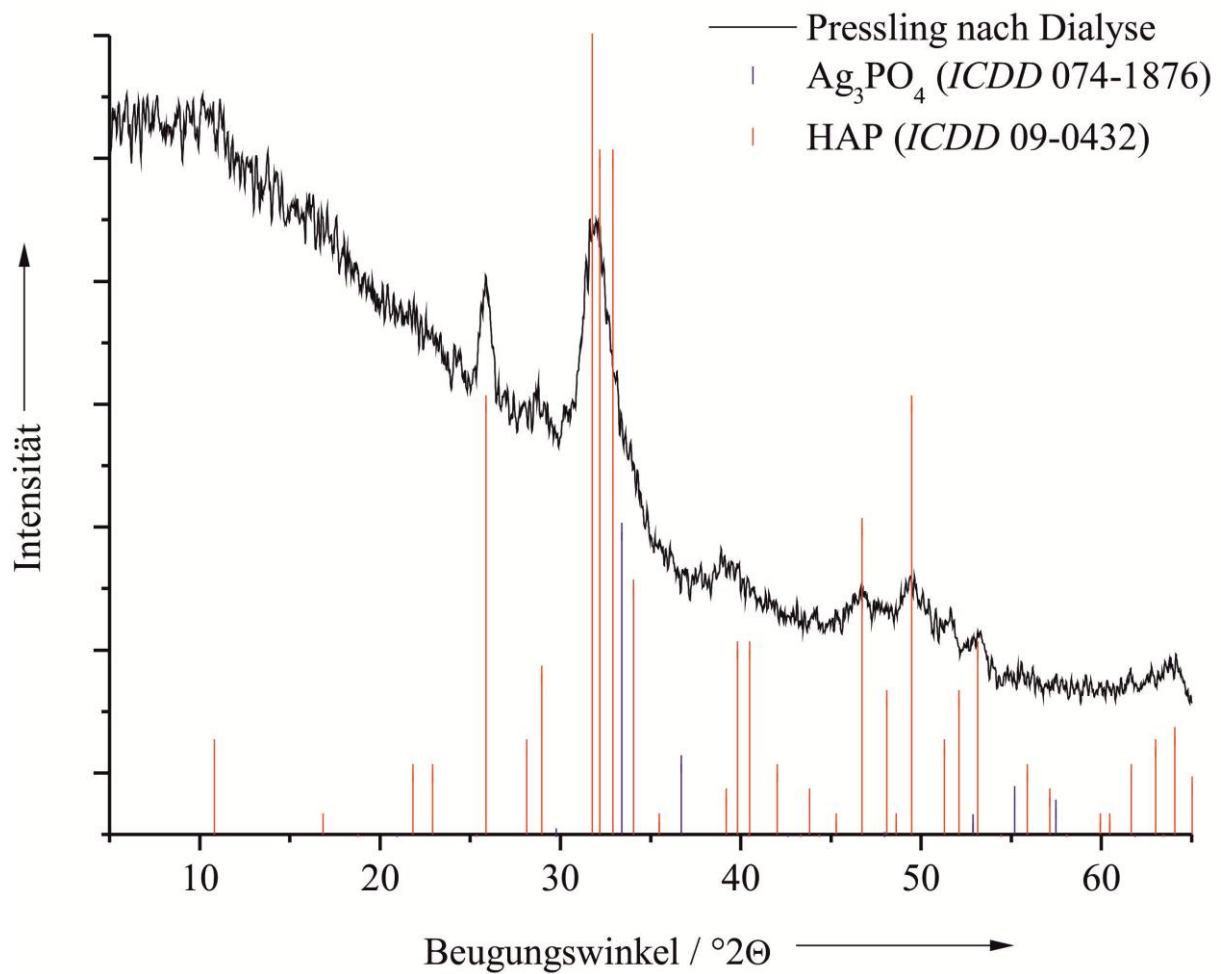
**Abbildung 124:** Hydroxylapatit-Presslinge mit A) 0 Gew.-% Silber und B) 1,78 Gew.-% Silber für die Dialyse zur Silberfreisetzung.

In **Abbildung 125** ist die Silberfreisetzung aus Silber-dotiertem Hydroxylapatit mit einem Silbergehalt von 1,78 Gew.-% Silber gezeigt. In den Presslingen sind ca. 3,3 mg Silber enthalten. Nach 88 Tagen sind  $197 \mu\text{g L}^{-1}$  Silberionen freigesetzt worden, das entspricht 6 % der im Apatit vorhanden Silberionen. Die Dialyse, ist durch die schwarzen Kurve dargestellt und wurde nach 88 Tagen beendet. Der Pressling wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie und Pulverdiffraktometrie analysiert. Das Pulverdiffraktogramm ist in **Abbildung 126** dargestellt. Es ist keine Veränderung der Kristallinität oder des Calciumphosphats durch die Dialyse erkennbar. **Abbildung 127** zeigt das rasterelektronenmikroskopische Bild von der Oberfläche des Presslings. Es sind ebenfalls nadel-förmige Partikel zu erkennen. Die nach 88 Tagen mittels AAS bestimmte Calciumkonzentration im Dialysat lag bei  $9,3 \text{ mg L}^{-1}$  Calcium. Somit wurden 15,0 % Calcium aus dem Pressling gelöst.

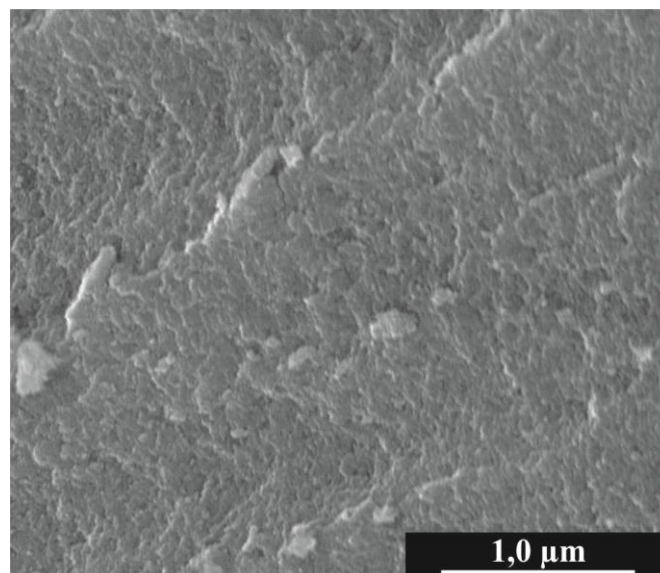


**Abbildung 125:** Freisetzungskurven von Silber-dotiertem Hydroxylapatit mit einem Silberanteil von 1,78 Gew.-%.





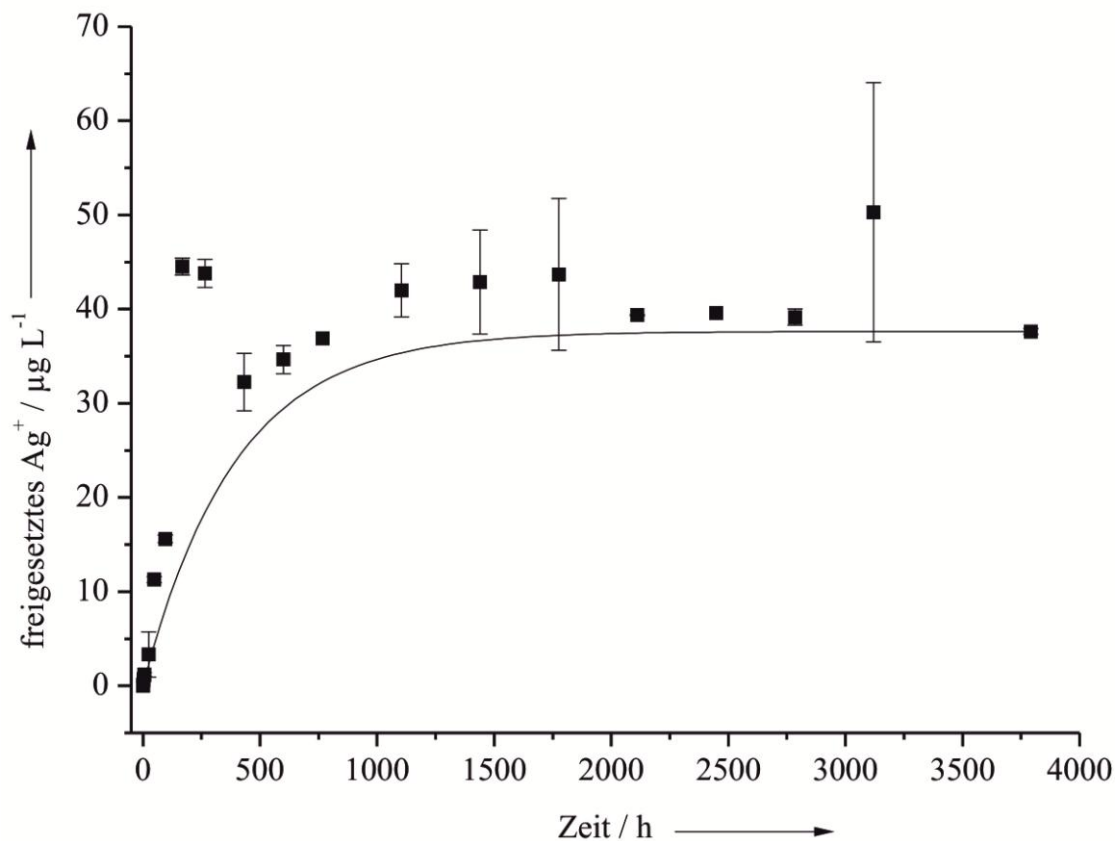
**Abbildung 126:** Pulverdiffraktogramm von einem Hydroxylapatit-Pressling nach 88 Tagen Dialyse mit einem Silberanteil von 1,78 Gew.-% Silber.



**Abbildung 127:** REM-Bild eines Hydroxylapatit-Presslings mit einem Silbergehalt von 1,78 Gew.-% Silber nach 88 Tagen Dialyse.

Bei der Dialyse des Presslings, dargestellt durch die rote Kurve in **Abbildung 125**, wurde der Pressling nach 88 Tagen zerbrochen und die Dialyse weiter geführt. Es ist keine Veränderung der freigesetzten Silberionen zu erkennen. Die Silberfreisetzung, dargestellt in der grünen Kurve, wurde unverändert fortgeführt. Es ist zu sehen, dass sich ein Gleichgewichtszustand nach ca. 46 Tagen einstellt und keine weiteren Silberionen mehr aus dem Hydroxylapatit gelöst werden. Das Gleichgewicht liegt bei einer Freisetzung von ca. 7 % der im Pressling vorhandenen Silberionen.

Wie für die Presslinge mit einem Silberanteil von 1,78 Gew.-%, wurde auch die Silberfreisetzung für Presslinge mit einem Silberanteil von 0,88 Gew.-% bestimmt. In **Abbildung 128** ist die Freisetzungskurve dargestellt.

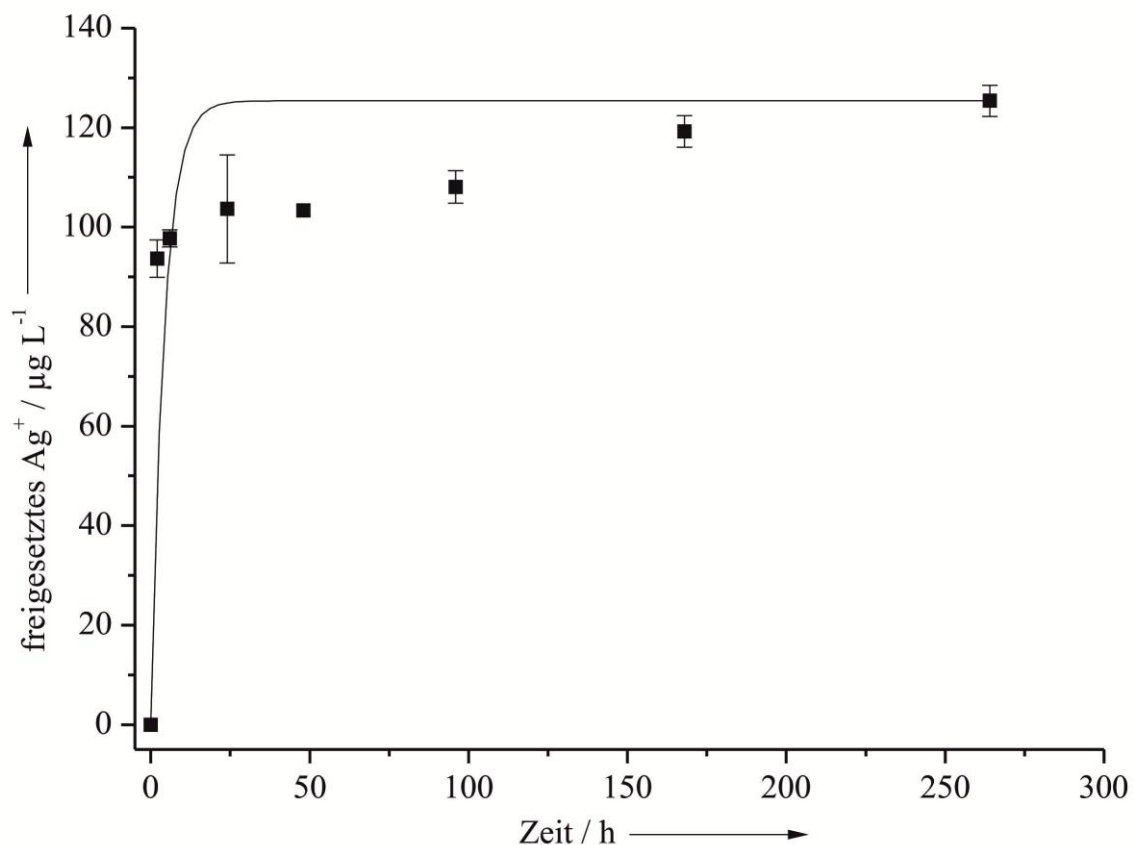


**Abbildung 128:** Freisetzungskurve von Silber-dotiertem Hydroxylapatit mit einem Silberanteil von 0,88 Gew.-%.



In den Presslingen sind ca. 1,6 mg Silberionen enthalten. In einem Zeitraum von 88 Tagen werden hier  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  Silberionen freigesetzt, das entspricht 2,4 % der im Apatit enthaltenen Silberionen. Auch hier stellt sich nach 46 Tagen ein Gleichgewichtszustand ein. Das Gleichgewicht liegt bei einer Freisetzung von ca. 3 % der im Pressling vorhanden Silberionen. Der Zeitraum bis zur Einstellung des Gleichgewichts ist bei beiden Untersuchungen gleich und damit unabhängig vom Silberanteil.

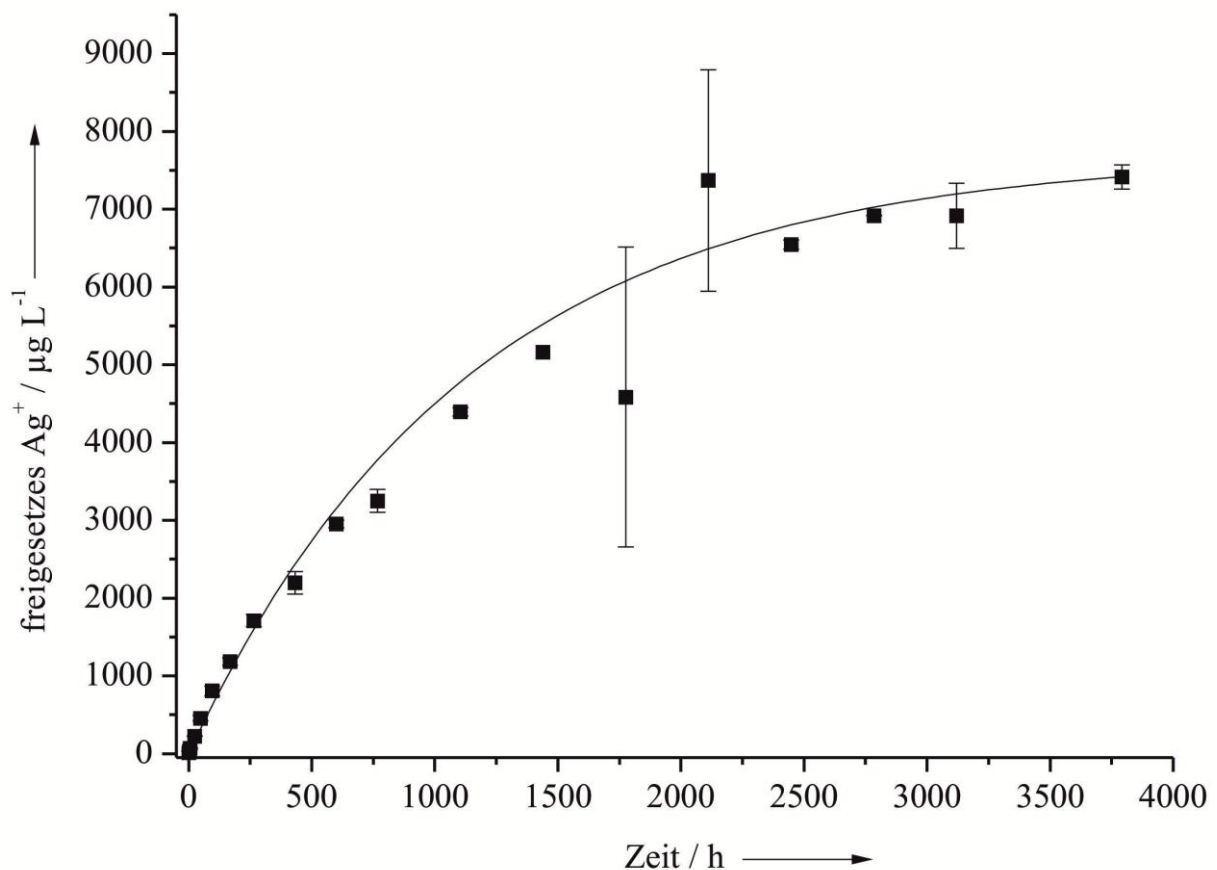
Um zu überprüfen, inwieweit sich die Silberfreisetzung bei einem Pulver verändert, wurde auch die Freisetzung von Silberionen aus einem Hydroxylapatit-Pulver mit einem Silberanteil von 1,57 Gew.%, gemessen. Dazu wurden 200 mg Pulver anstelle der Presslinge verwendet. In dem Pulver sind ca. 3,0 mg Silberionen enthalten. Die Freisetzungskurve ist in **Abbildung 129** dargestellt.



**Abbildung 129:** Freisetzungskurve von Silber-dotiertem Hydroxylapatit (Pulver) mit einem Silberanteil von 1,57 Gew.-%.

Nach 11 Tagen wurden  $125 \mu\text{g L}^{-1}$  Silberionen freigesetzt, das entspricht 4 % der im Apatit vorhandenen Silberionen. Der Gleichgewichtszustand stellt sich hier schon sehr früh, nach 4 Tagen, ein. Das Gleichgewicht liegt hier bei 3 % der im Pulver enthaltenen Silberionen. Die schnelle Einstellung des Gleichgewichtszustandes ist auf die um ein Vielfaches größere Oberfläche des Pulvers im Vergleich zu den Presslingen zurückzuführen.

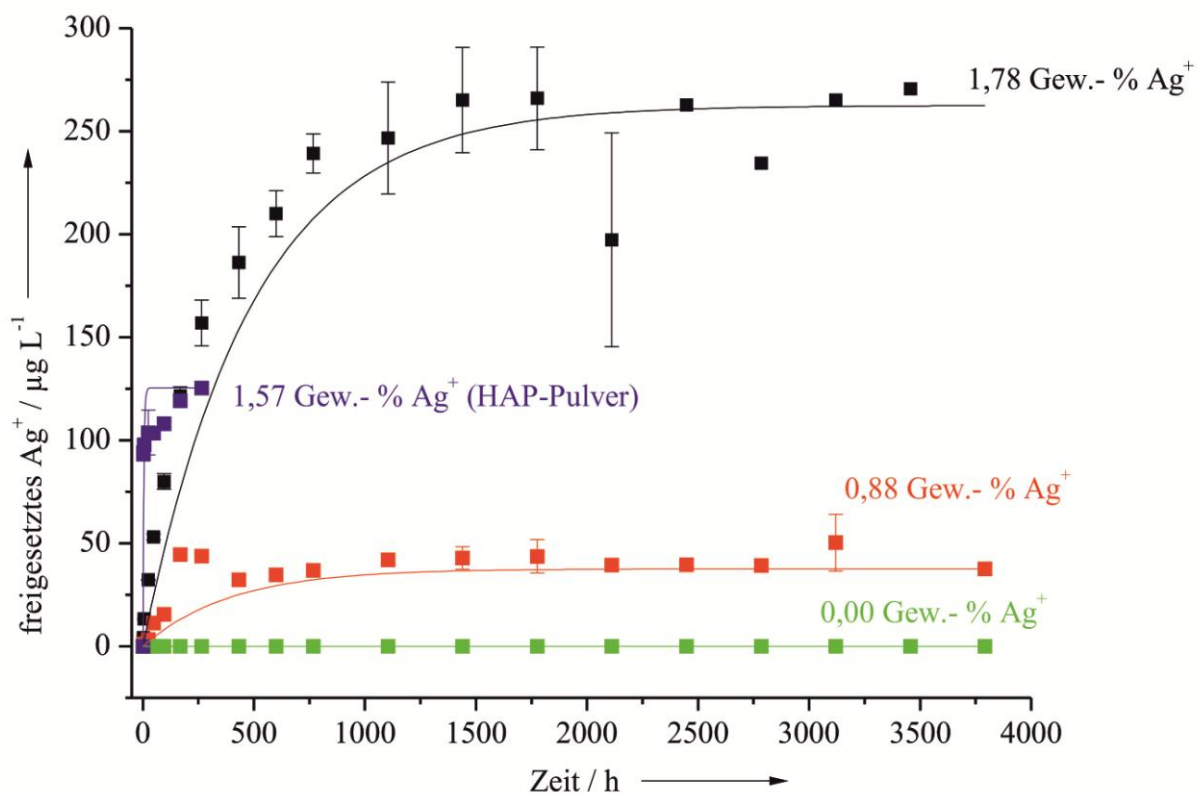
Neben der Silberfreisetzung aus dem Silber-dotierten Hydroxylapatit wurde auch die Silberfreisetzung aus dem schwer löslichen Silberphosphat untersucht. Der Silbergehalt in diesen Presslingen ist mit 140 mg signifikant höher. In **Abbildung 130** ist die Silberfreisetzung aus  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  grafisch dargestellt.



**Abbildung 130:** Freisetzungskurve von Silberphosphat.

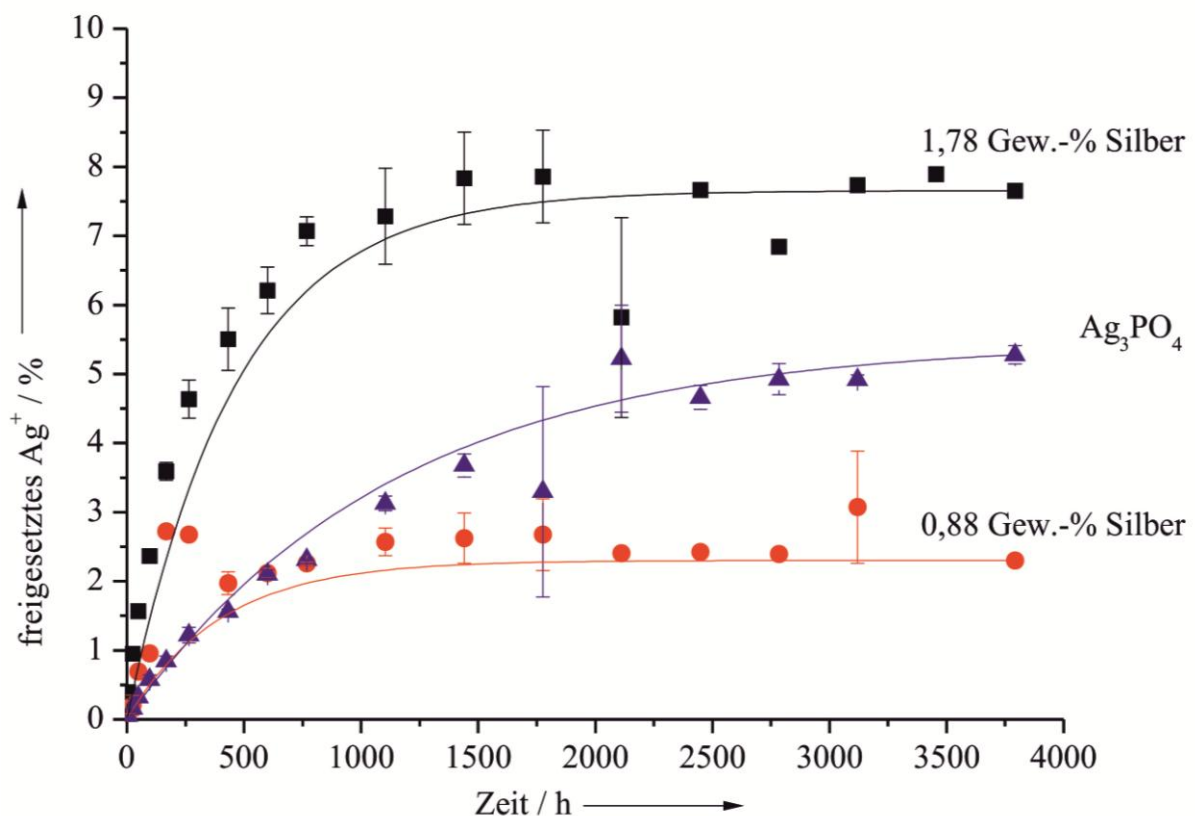
Von den 140 mg Silber wurden hier nach 88 Tagen ca. 4 mg Silber freigesetzt. Dies entspricht 3,5 % der im Pressling enthaltenen Silberionen. Dieser Anteil von gelöstem Silber ist recht hoch, da Silberphosphat der Literatur nach nahezu unlöslich in Wasser ist.<sup>[134]</sup> Im Vergleich zu den Silber-dotierten Hydroxylapatit-Proben stellt, sich bei Silberphosphat nach 46 Tagen kein Gleichgewicht ein.

In **Abbildung 131** und **Abbildung 132** sind die verschiedenen Freisetzungskurven zum besseren Vergleich noch einmal gemeinsam dargestellt. **Abbildung 131** zeigt die Auftragung in  $\mu\text{g L}^{-1}$ , und in **Abbildung 132** ist die prozentuale Auftragung dargestellt. Die pH-Werte lagen während der gesamten Freisetzung bei einem pH-Wert von 7.



**Abbildung 131:** Freisetzungskurven von HAP mit 1,78 Gew.-% Silber (schwarz), HAP mit 0,88 Gew.-% Ag (rot), HAP-Pulver mit 1,57 Gew.-% Silber (blau) und reinem Hydroxylapatit (grün).

In **Abbildung 131** ist sehr gut zu sehen, dass die größte Menge an Silberionen aus dem Apatit mit 1,78 Gew.-% Silberionen freigesetzt wurde. Die Silberfreisetzung aus dem HAP-Pulver mit 1,57 Gew.-% Silberionen liegt zwischen der der Pressling-Proben; jedoch stellt sich das Gleichgewicht schneller ein, da die Oberfläche des Pulvers größer ist. Als Blindprobe wurde reiner Hydroxylapatit vermessen, und es konnte kein Silber nachgewiesen werden.



**Abbildung 132:** Prozentuale Freisetzungskurven von HAP mit 1,78 Gew.-% Silberionen (schwarz), HAP mit 0,88 Gew.-% Ag (rot) und Silberphosphat (blau).

In **Abbildung 132** ist sehr gut zu erkennen, dass sich bis zu 7,6 % Silberionen aus dem HAP mit 1,78 Gew.-% Silber lösen. Aus dem HAP mit 0,88 Gew.-% Silber lösen sich ca. 3 % der Silberionen und aus Silberphosphat werden ca. 5 % Silberionen gelöst. Aus dem Silber-dotierten HAP-Pulver mit 1,57 Gew.-% Silberionen werden ca. 4 % der Silberionen gelöst. Die Menge der freigesetzten

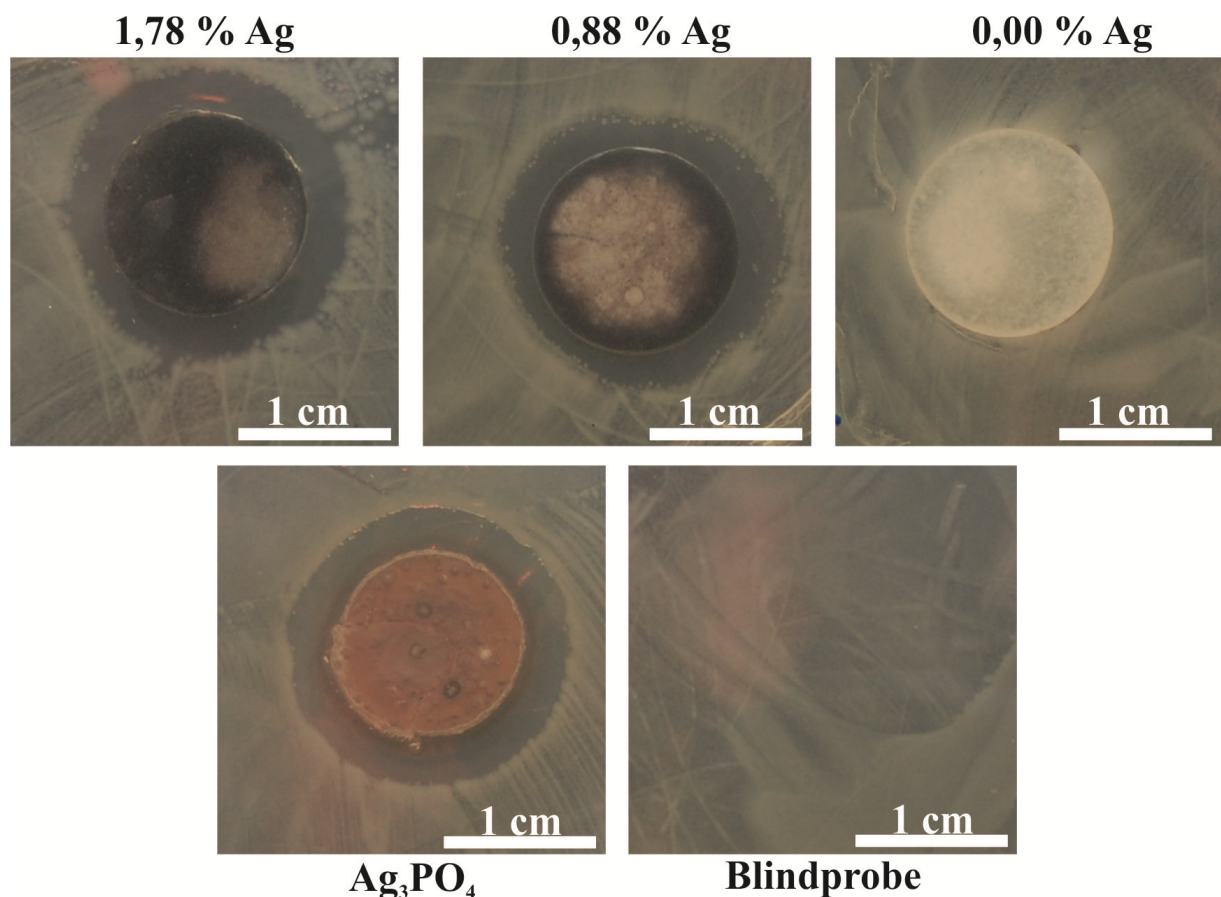
Silberionen liegt für alle Proben über der in der Literatur<sup>[135]</sup> beschriebenen Hemmkonzentration von  $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$  für *E. coli* oder  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$  für *S. aureus* Bakterien, jedoch unter der Toxizitätsgrenze von  $5\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$  für Zellen.<sup>[135]</sup> Daraufhin wurden die im Folgenden beschriebenen Bakterien- und Zelltests durchgeführt.

In der Literatur<sup>[131]</sup> wurde die Silberfreisetzung aus Silber-dotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln beschrieben. Die Freisetzung aus den Nanopartikeln ist wesentlich schneller, da sich der Gleichgewichtszustand bereits nach einem Tag einstellt.

Die Silberfreisetzung aus Silbernanopartikeln ist ebenfalls deutlich schneller, hier stellt sich das Gleichgewicht nach 4 Tagen ein.<sup>[133]</sup> In der Literatur<sup>[39]</sup> wurde die Silberfreisetzung aus Silber-dotiertem Phosphatgläsern gezeigt. Der Verlauf der Silberfreisetzung scheint auch hier langsamer zu verlaufen, da der Gleichgewichtszustand hier selbst nach 6 Tagen nicht erreicht wurde. Weiter ist hier auch bei höherem Silbergehalt eine geringere Silberfreisetzung zu sehen.<sup>[39]</sup>

#### 5.4.2 Die antibakterielle Wirkung von Silber-Hydroxylapatit

Um die antibakterielle Wirkung des hergestellten Silber-dotierten Hydroxylapatits zu zeigen, wurden Bakterientests mit *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. Dazu wurden je drei Presslinge mit einem Silberanteil von 1,78 und 0,88 Gew.-% auf einen Bakterienrasen aus *E. coli* gelegt. Die Bakterien wurden auf einem Nährboden aus Agar-Agar für 18 h mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  LB-Broth-Nährmedium inkubiert. Dasselbe Verfahren wurde auch für Presslinge aus reinem HAP und Silberphosphat durchgeführt. Zur Kontrolle der Bakterien wurde ein Bakterienrasen ohne jegliche Presslinge inkubiert. In **Abbildung 133** sind Bilder der verschiedenen Presslinge nach 18 h gezeigt. Die Ausbildung von Hemmhöfen ist ein Maß für die antibakterielle Wirkung.<sup>[136, 137]</sup>



**Abbildung 133:** Bakterientests mit *E. coli* in Gegenwart von HAP-Presslingen mit einem Silberanteil von 1,78 Gew.-% und 0,88 Gew.-% Silber, von reinem HAP und von Silberphosphat nach 18 Stunden Inkubationszeit.

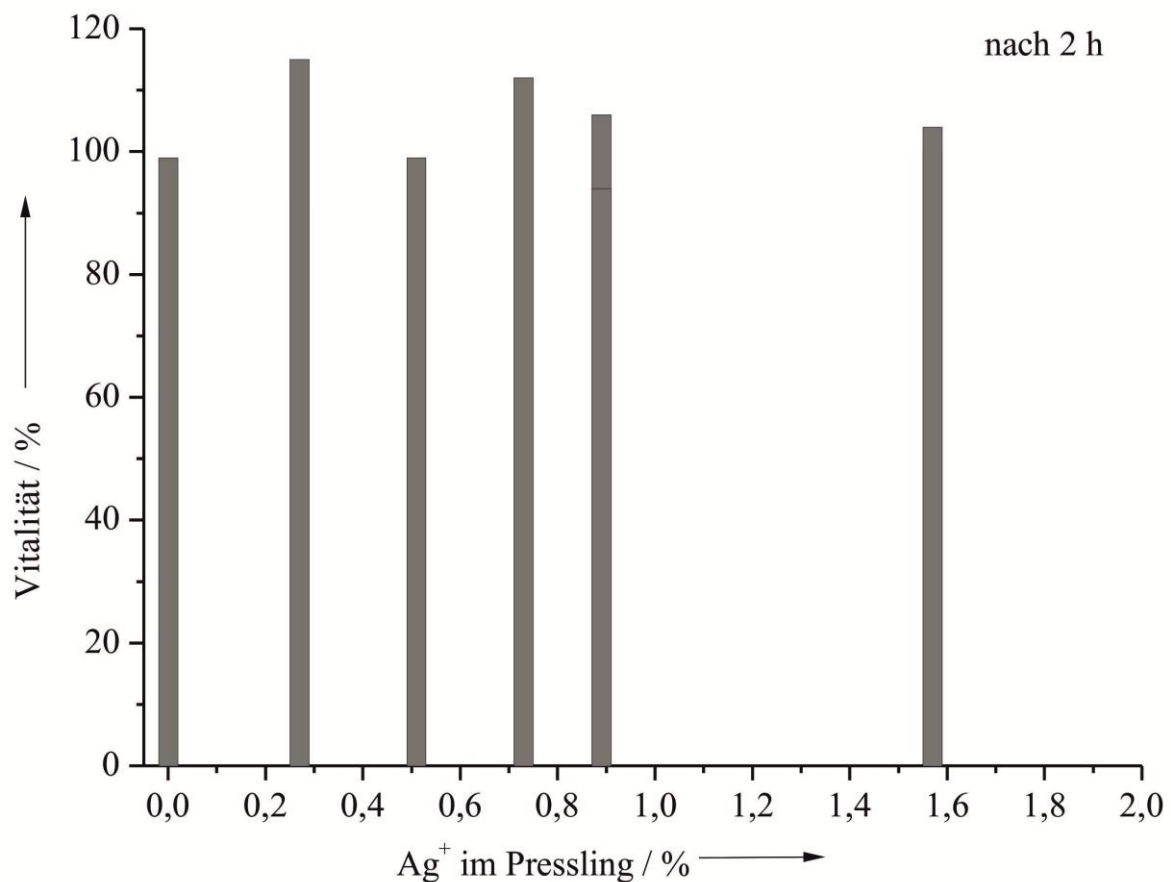
In dieser Abbildung ist die antibakterielle Wirkung der Presslinge aus Silber-dotiertem HAP durch die Ausbildung von Hemmhöfen deutlich zu sehen. Die Presslinge aus Silberphosphat zeigen ebenfalls eine antibakterielle Wirkung, was der Erwartung der Silberfreisetzungskurve entspricht. Die reinen Hydroxylapatitpresslinge zeigen keine Hemmhöfe und somit auch keine antibakterielle Wirkung. Die Antibakteriellwirkung des Silber-dotierten Hydroxylapatits war in dieser Form zu erwarten, da die bakterizide Wirkung von Silber gemäß der Literatur<sup>[135]</sup> schon bei  $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$  einsetzt.<sup>[138]</sup> Dieser Wert wird wie vorstehend beschrieben schon nach 2 Stunden für alle Silber-dotierten HAP-Proben überschritten. Anhand der Blindprobe ohne Pressling ist zu sehen, dass keine Bakterien abgestorben sind und die Hemmhöfe vom Silber herrühren.

Wie in der Literatur<sup>[16, 136, 137]</sup> beschrieben und gezeigt, können durch die Größe bzw. den Durchmesser der Hemmhöfe auch Rückschlüsse auf den Grad der antibakteriellen Wirkung gezogen werden. In **Abbildung 133** ist mit steigendem Silberanteil keine Vergrößerung der Hemmhöfe zu beobachten. Dieses Bild spiegelt sich auch in der Literatur wider.<sup>[16, 17, 37, 39]</sup> Auffallend ist, dass in der Literatur die Hemmhöfe erst bei wesentlich höheren Silberanteilen von 5-6 % Silber, annähernd die gleiche Größe wie die gezeigten Proben erreichen.<sup>[16]</sup> Demnach scheint das hier hergestellte Material bei geringeren Silberanteilen eine größere antibakterielle Wirkung zu besitzen.



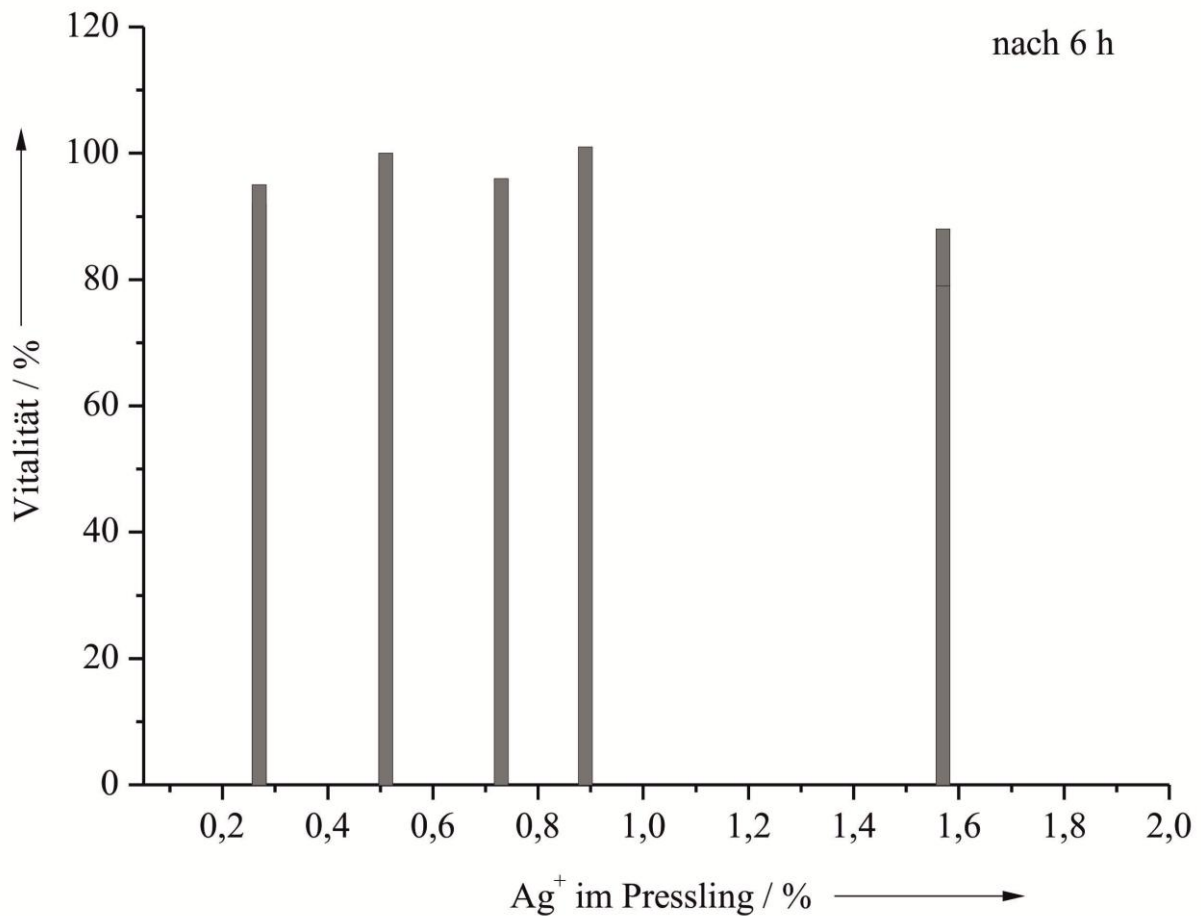
### 5.4.3 Die Wirkung von Silber-dotiertem HAP auf Zellen

Da, wie in Kapitel 5.4.2 gezeigt, Silber-dotierter Hydroxylapatit eine antibakterielle Wirkung hat, wurde seine Wirkung auch auf Epithelzellen (HeLa-Zellen) getestet. Die Zelltests wurden von SOKOLOVA und ROTAN durchgeführt. Dazu wurden je 50.000 Zellen in Gegenwart der Silber-HAP-Presslinge für 2 h, 6 h, 24 h und 48 h mit 0,5 mL DMEM + FCS kultiviert. Es wurden geviertelte Presslinge mit unterschiedlichen Anteilen an Silber verwendet. Zur Kontrolle der Zellexperimente wurden die Zellen auch in Gegenwart von reinem Hydroxylapatit kultiviert. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test gemessen. In **Abbildung 134** sind die Ergebnisse der Zellvitalität nach zwei Stunden gezeigt. Bei allen Versuchen sind die Zellen im Rahmen der Fehlertoleranz noch zu 100 % vital.



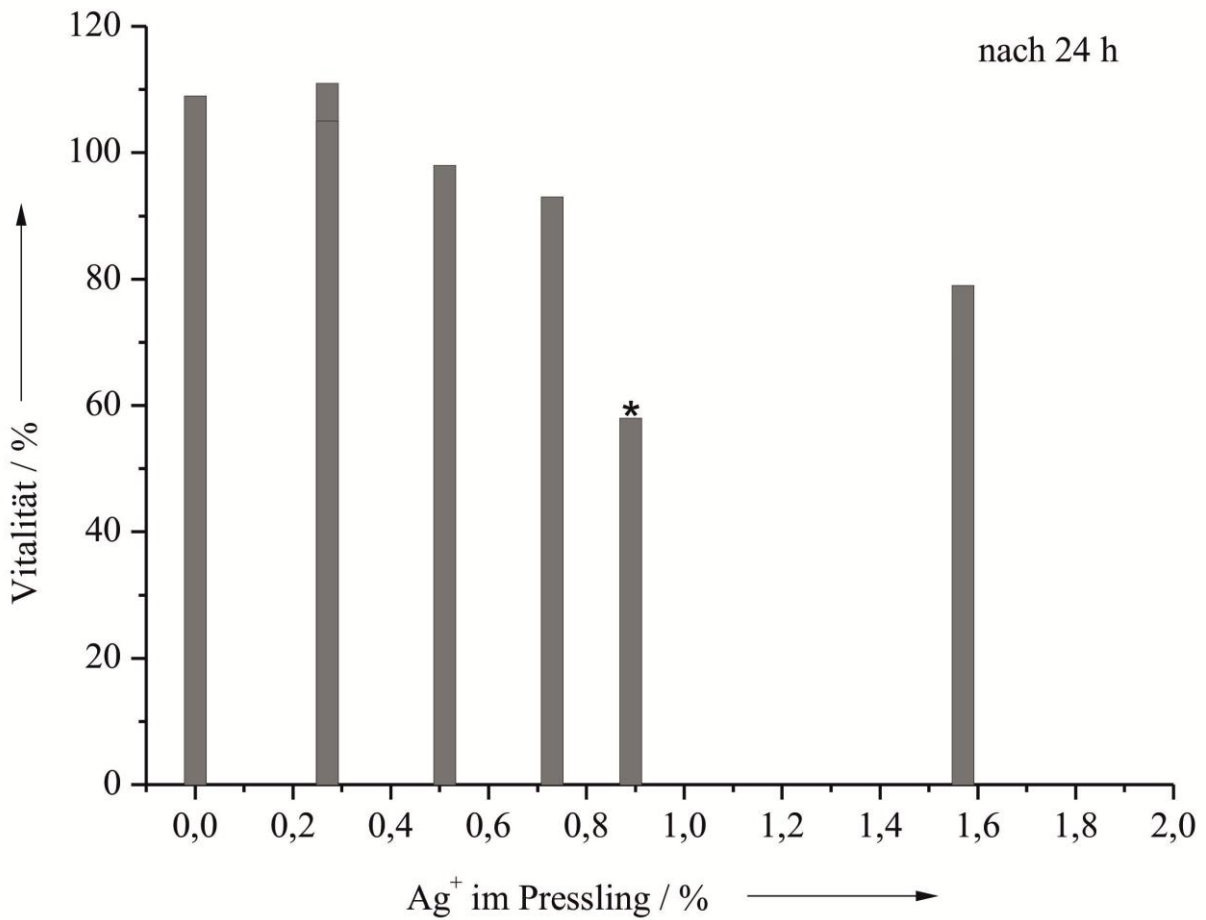
**Abbildung 134:** HeLa-Zelltests mit Silber-dotiertem Hydroxylapatit nach zwei Stunden Inkubationszeit.

Wie in **Abbildung 135** zu sehen ist, sind die Zellen auch nach 6 Stunden größtenteils noch vital. Die Vitalitätsrate liegt bei ca. 98 %.



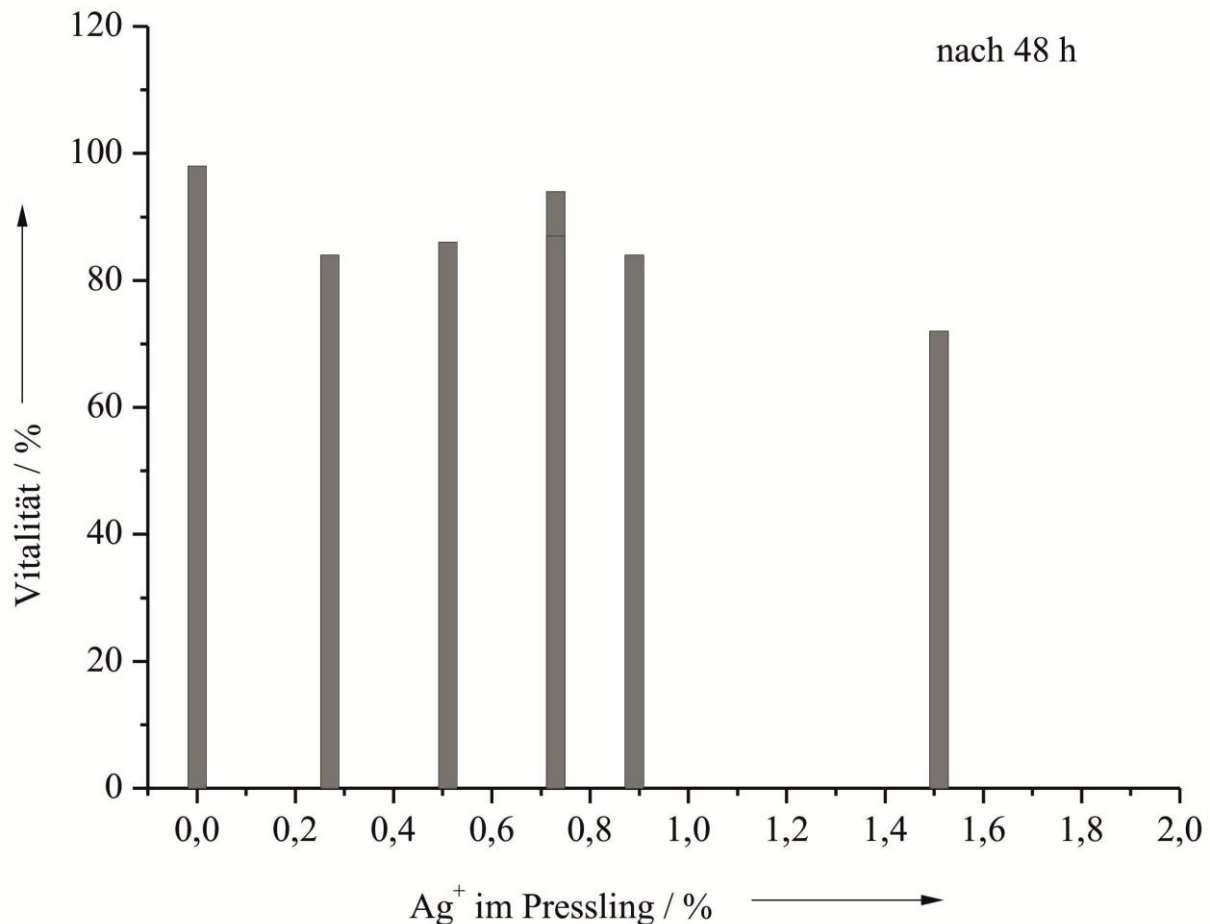
**Abbildung 135:** HeLa-Zelltests mit Silber-dotiertem Hydroxylapatit nach 6 Stunden Inkubationszeit.

Um einen besseren Vergleich zu den in Kapitel 5.4.2 durchgeführten Bakterientest zu bekommen, wurden die Zellen wie oben beschrieben auch für 24 Stunden in Gegenwart der Silber-HAP-Presslinge kultiviert. Die Ergebnisse der Vitalität der Zellen sind in **Abbildung 136** dargestellt.



**Abbildung 136:** HeLa-Zelltests mit Silber-dotiertem Hydroxylapatit nach 24 Stunden Inkubationszeit.

Die Vitalität der Zellen liegt bis zu einem Silberanteil von 0,51 % Silber im Pressling bei 99 %, bei höheren Silberanteilen fällt die Vitalität auf ca 73 % ab. Auffallend ist die Probe mit einem Silberanteil von 0,88 % Silber, hier liegt die Vitalität bei nur 58 %. Aus diesen Ergebnissen lässt sich im Vergleich zu den Bakterientests mit *E. coli* schließen, dass das hergestellte Material zwar antibakteriell, jedoch nicht zelltoxisch ist. Um zu überprüfen, wie sich die Vitalität der Zellen im weiteren Verlauf verändert, wurden die HeLa-Zellen auch 48 Stunden in Gegenwart der Silber-dotierten Hydroxylapatit-Presslinge kultiviert. Die Vitalität nach 48 Stunden ist in **Abbildung 137** dargestellt.

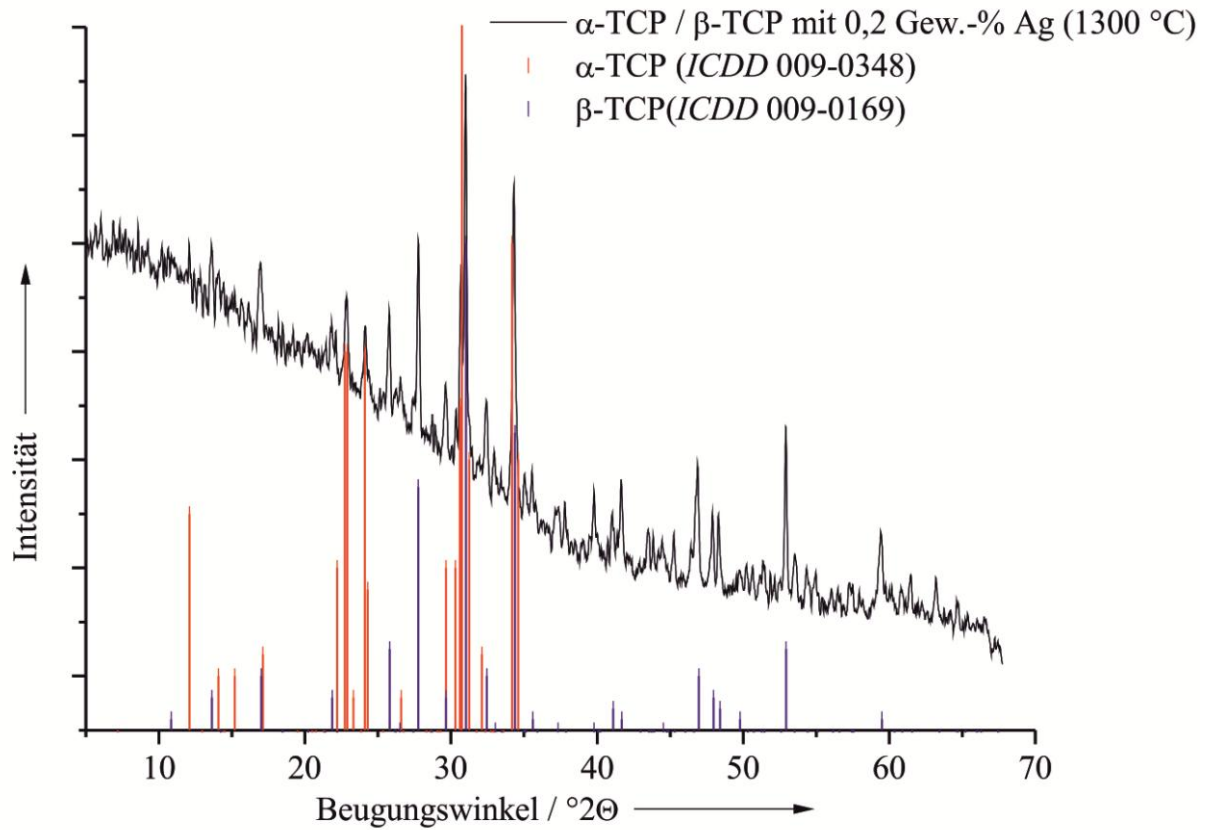


**Abbildung 137:** HeLa-Zelltests mit Silber-dotiertem Hydroxylapatit nach 48 Stunden Inkubationszeit.

Nach 48 Stunden liegt die Vitalität der Zellen nicht unter 72 %, somit sind bis zu 28 % der Zellen abgestorben. Wie oben bereits beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der Silber-dotierte Hydroxylapatit eine antibakterielle Wirkung hat, aber nicht zelltoxisch ist. Die freigesetzte Menge an Silber, wie in Kapitel 5.4.1 gezeigt, liegt unter dem für Zellen toxischen Wert von  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .<sup>[135, 138]</sup>

Im Vergleich zu der in der Literatur für Calciumphosphat-Nanopartikel gezeigten Vitalität der Zellen von 70-80 %, liegt die Vitalität der Zellen hier im gleichen Vitalitätsbereich.<sup>[139, 140]</sup>





**Abbildung 139:** Pulverdiffraktogramm von  $\alpha/\beta$ -TCP mit 0,20 Gew.-% Ag, hergestellt aus HAP mit 1,51 Gew.-% Ag bei 1300 °C.

**Tabelle 15:** Berechnete Gitterparameter

Probe	Gitterparameter / Å	Volumen / Å
$\beta$ -TCP mit 1,71 Gew.-% Ag	$a = 10,440; c = 37,392$ (rhombisch)	$3529,8 \pm 0,1$
$\beta$ -TCP mit 0 Gew.-% Ag	$a = 10,441; c = 37,395$ (rhombisch)	$3530,5 \pm 0,1$
$\beta$ -TCP Literatur <sup>[141]</sup>	$a = 10,435; c = 37,403$ (rhombisch)	3527,3

In **Tabelle 16** ist die chemische Zusammensetzung der  $\alpha/\beta$ -TCP-Probe dargestellt. Der Silberanteil in der Probe ist auf 0,20 Gew.-% gesunken. Dieser geringe Silberanteil kann auf das Verdampfen von Silber zurückgeführt werden.

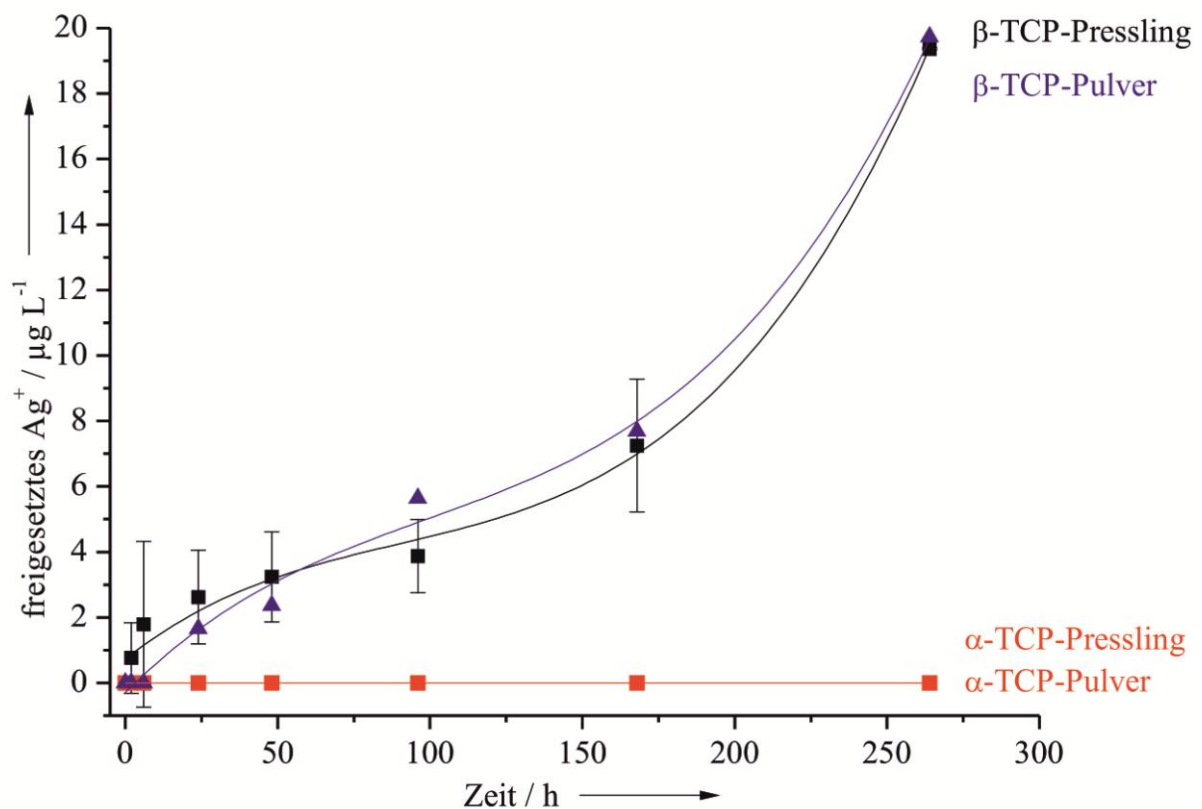
**Tabelle 16:** Zusammensetzung der Silber-dotierten Calciumphosphate, hergestellt aus Silber-dotiertem HAP.

<b>Temperatur</b> / °C	<b>Ca<sup>2+</sup></b> / Gew.-%	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b> / Gew.-%	<b>Ag<sup>+</sup></b> / Gew.-%	<b>Ca / P-</b> <b>Verhältnis</b>	<b>Ca+Ag / P-</b> <b>Verhältnis</b>
<b>850</b>	38,53	57,70	1,71	1,58	1,61
<b>1300</b>	39,13	61,20	0,20	1,52	1,52

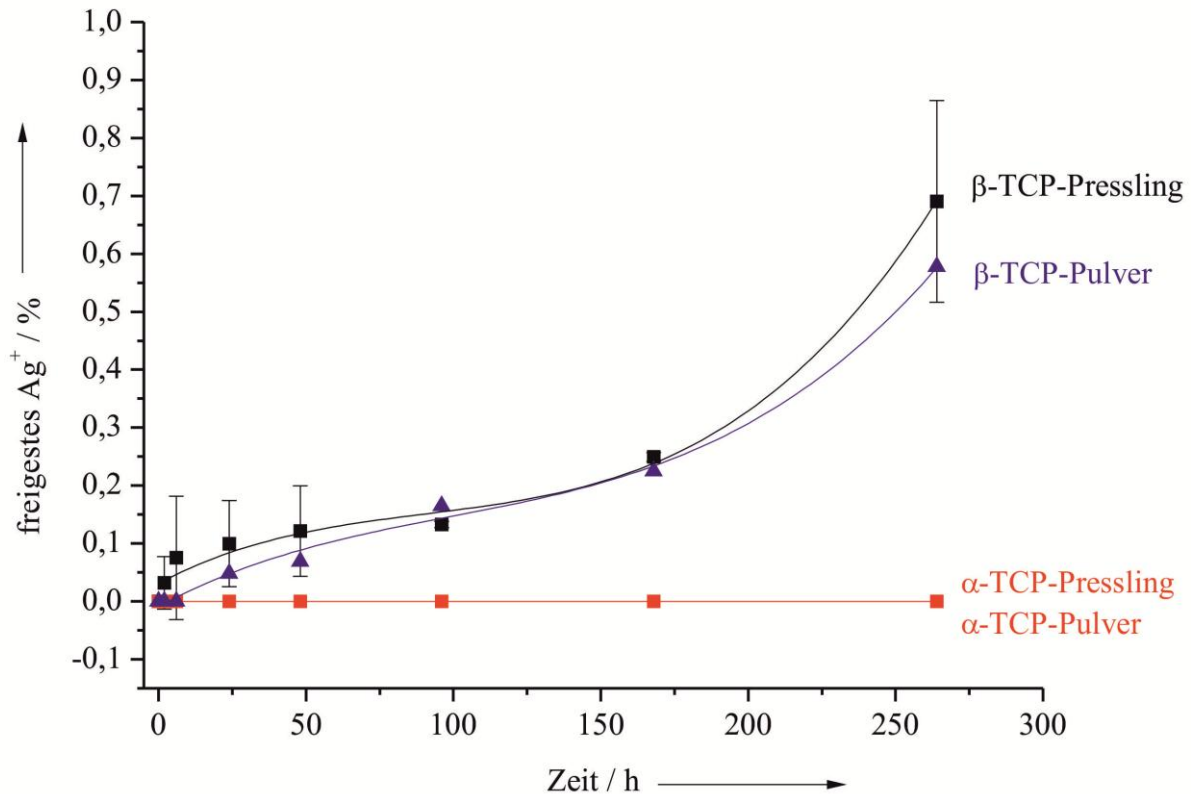


#### 5.4.4.1 Die Silberfreisetzung aus Silber-dotiertem $\beta$ -TCP und $\alpha$ -TCP

Wie für die Silber-dotierten HAP-Proben wurde auch für  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP die Freisetzung von Silberionen untersucht. Für  $\alpha$ -TCP konnte weder für das Pulver noch für die Presslinge eine Silberfreisetzung beobachtet werden, was in **Abbildung 140** und **Abbildung 141** dargestellt ist. Für  $\beta$ -TCP konnte nur eine sehr geringe Freisetzung der Silberionen beobachtet werden. So wurden nach 11 Tagen  $19 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0,6 \%$ ) Silberionen freigesetzt. Der Unterschied zwischen der Pulverprobe und den Presslingen ist nicht signifikant, wie in **Abbildung 140** und **Abbildung 141** zu sehen ist. Ein Gleichgewichtszustand hat sich nach 11 Tagen noch nicht eingestellt.



**Abbildung 140:** Silberfreisetzung aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -TCP-Presslingen und Pulvern in  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



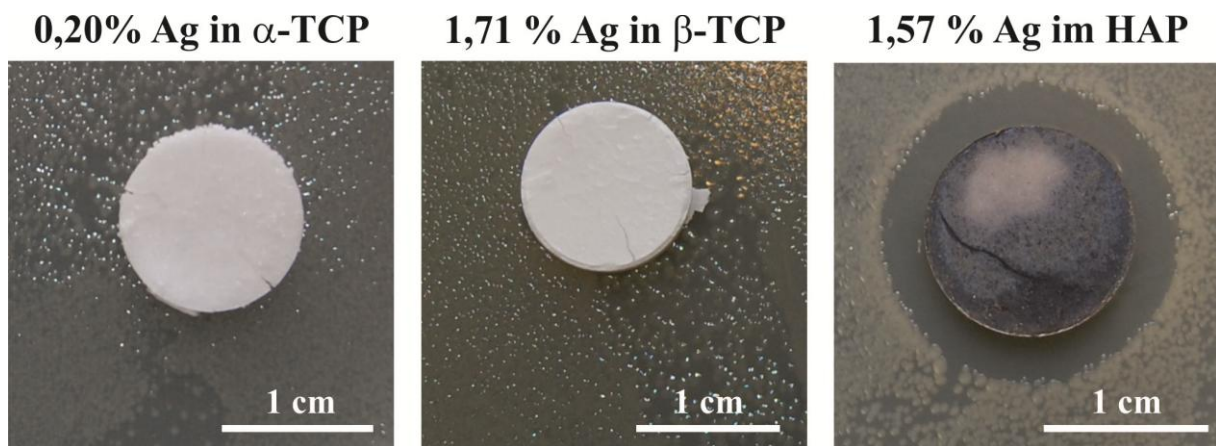
**Abbildung 141:** Silberfreisetzung aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -TCP-Presslingen und Pulvern in %.

Die geringe Silberfreisetzung aus  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP kann auf die geringere Löslichkeit dieser Tricalciumphosphate im Vergleich zu Hydroxylapatit zurückgeführt werden.<sup>[2]</sup>

Da die Silberkonzentration nach 18 Stunden unter der bakteriziden Konzentration für *E. coli* Bakterien liegt, ist zu vermuten, dass die Tricalciumphosphate keine antibakterielle Wirkung zeigen.<sup>[135]</sup> Um dies zu überprüfen, wurden die im Folgenden gezeigten Bakterientests durchgeführt.

### 5.4.4.2 Die antibakterielle Wirkung von Silber-dotiertem $\beta$ -TCP und $\alpha$ -TCP

Um auch die Antibakteriellwirkung von  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP zu überprüfen, wurden Bakterientests mit *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. Dazu wurden je drei Presslinge mit einem Silberanteil von 1,71 und 0,2 Gew.-% auf einen Bakterienrasen aus *E. coli* gelegt. Die Bakterien befanden sich auf einem Agar-Agar-Nährboden und wurden für 18 h mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  LB-Broth-Nährmedium inkubiert. Dasselbe Verfahren wurde zum Vergleich auch für Presslinge bestehend aus HAP mit 1,57 Gew.-% durchgeführt. In **Abbildung 142** sind Bilder der verschiedenen Presslinge nach 18 h gezeigt.



**Abbildung 142:** Bakterientests mit *E. coli* nach 18 Stunden für HAP,  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP.

Wie die Freisetzungskurven bereits vermuten ließen, zeigen  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP keine antibakterielle Wirkung auf *E. coli*, da bei  $\alpha$ -TCP keine Silberionen freigesetzt werden und bei  $\beta$ -TCP die Menge der freigesetzten Silberionen unter der bakteriziden Konzentration von  $0,35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  liegt.<sup>[135]</sup> Der Hydroxylapatit-Pressling zeigt hingegen erwartungsgemäß einen ausgeprägten Hemmhof, so dass hier, wie in Kapitel 5.4.2 gezeigt, eine antibakterielle Wirkung des Materials nachweisbar ist.

#### **5.4.5 Zusammenfassung des Kapitels: Silber-dotierter Hydroxylapatit**

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich Silber-dotierter Hydroxylapatit mit einem Silberanteil von bis zu 1,78 Gew.-% herstellen lässt. Das Ca/P-Verhältnis liegt bei allen Proben im Bereich von calciumdefizitärem Apatit, was für das verwendete Herstellungsverfahren nicht ungewöhnlich ist. Die hergestellten Proben sind in Abhängigkeit der Silberkonzentration amorph bis nanokristallin. Der Carbonatgehalt in den Proben liegt unter 1 % und ist auf in Wasser gelöstes CO<sub>2</sub> zurückzuführen.

Durch die Messung der Silberfreisetzung wurde gezeigt, dass bis zu 7,6 % Silber in Abhängigkeit von der Silberkonzentration in den Presslingen freigesetzt werden. Es stellt sich für alle Silber-dotierten HAP-Proben ein Gleichgewicht nach ca. 46 Tagen ein. Durch die Freisetzungskurven wurde auch nachgewiesen, dass sich aus dem in Wasser unlöslichen Silberphosphat ein prozentualer Anteil von 3 % Silberionen löst. Die Silberfreisetzung aus den HAP-Presslingen verläuft im Vergleich zu Silbernanopartikeln und Silber-dotierten Calciumphosphat-Nanopartikeln sehr langsam.<sup>[142]</sup> Die Freisetzung von Silber aus Silber-dotiertem HAP-Pulver ist schneller als die aus den Presslingen, jedoch langsamer als die aus den CaP-Nanopartikeln und Silbernanopartikeln.

Durch Tests mit *E. coli* konnte auch die antibakterielle Wirkung des hergestellten Materials gezeigt werden. Bei allen Silber-dotierten HAP-Presslingen war ein Hemmhof um den Pressling zu beobachten.

Die zelltoxische Wirkung von Silber-dotiertem HAP wurde an HeLa-Zellen getestet. Es konnte mittels MTT-Tests gezeigt werden, dass der Silber-dotierte Hydroxylapatit nicht zelltoxisch ist. Die freigesetzte Konzentration an Silberionen liegt unter der Toxizitätsgrenze von Zellen.<sup>[135]</sup>

Durch Calcinieren des Hydroxylapatits lassen sich die Hochtemperaturphasen  $\beta$ -TCP und  $\alpha$ -TCP herstellen. Diese beiden Silber-dotierten Calciumphosphatphasen haben im Gegensatz zu dem Silber-dotierten Hydroxylapatit keine antibakterielle Wirkung.

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich in Gegenwart der Aminosäuren *O*-Phospho-L-Tyrosin, L-Tyrosin, *O*-Phospho-L-Serin, L-Serin, und L-Alanin Calciumphosphat-Hohlpartikel herstellen lassen. Die Calciumphosphat-Hohlpartikel haben eine Größe zwischen 200 nm und 500 nm. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass sich in Gegenwart der Dipeptide Serin-Tyrosin sowie Alanin-Tyrosin Calciumphosphat-Hohlpartikel mit einer Größe zwischen 200-300 nm herstellen lassen. Die Hohlpartikel bestehen aus einer Calciumphosphat-Schale, die sich aus kleinen 10 nm kleinen Calciumphosphat-Nanopartikeln aufbaut. Die Stärke der Schale liegt zwischen 10-30 nm. Mittels der Rasterkraftmikroskopie und der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie konnte bewiesen werden, dass die Partikel tatsächlich hohl vorliegen. Aus diesen Versuchen wird klar, dass die mit der Rasterelektronenmikroskopie beobachteten aufgebrochenen Partikel keine Trocknungsartefakte sind, sondern es sich in der Tat um hohle Strukturen handelt. Durch verschiedene Stabilitätstests konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Hohlpartikeln um einen metastabilen Zustand handelt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine supramolekulare Selbstorganisation von Aminosäuren bzw. Dipeptiden in Wasser gezeigt. Die Aminosäuren und Dipeptide bilden Vesikel aus, die mittels der *Nanoparticle Tracing Analysis* und der Rasterkraftmikroskopie erstmals gezeigt werden konnten. Mittels der Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie konnte eine pH-abhängige Clusterbildung von Aminosäuren nachgewiesen werden. Durch den Clusterbildungseffekt und NMR-Titration konnte gezeigt werden, dass es sich um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen einzelnen Aminosäuremolekülen bzw. Dipeptidmolekülen handelt. Diese Wechselwirkung ist auf den zwitterionischen Charakter der Aminosäuren und Dipeptide zurückzuführen. Eine

solche Selbstorganisation von Aminosäuren bzw. Dipeptiden wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Aus den im zweiten Teil dieser Arbeit beobachteten Aminosäurevesikeln konnte ein Modell für den Bildungsmechanismus erstellt und so die Bildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel erklärt werden. In diesem Modell fungieren die Aminosäurevesikel als Templat für die Bildung der Calciumphosphat-Hohlpartikel.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Herstellung von Silber-dotiertem Hydroxylapatit gezeigt. Mit dem verwendeten kontinuierlichen Syntheseverfahren lässt sich Hydroxylapatit mit einem Silberanteil von bis zu 1,78 % Silber im Hydroxylapatit-Kristallgitter herstellen. Mittels Silber-Freisetzungsversuchen konnte gezeigt werden, dass bis zu 7,6 % von dem im Hydroxylapatit enthaltenen Silber über einen Zeitraum von 46 Tagen freigesetzt wurde. Eine Dialyseart, die noch getestet werden sollte, ist die Durchfluss-Dialyse, da es im menschlichen Organismus zu einem ständigen Austausch des Mediums um den verwendeten Apatit kommt.

Durch Bakterientests mit *E. coli* konnte auch die gewünschte antibakterielle Wirkung des Hydroxylapatits nachgewiesen werden. Durch Zelltests mit HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Silber-dotierte Hydroxylapatit nicht zelltoxisch ist.

Mittels Calcinieren des entstandenen Silber-dotierten Hydroxylapatits bei 850 °C bzw. 1300 °C wurden  $\beta$ -Tricalciumphosphat und  $\alpha$ -Tricalciumphosphat mit einem Silberanteil von 1,71 Gew.-% und 0,20 Gew.-% Silber hergestellt. Aufgrund der antibakteriellen Wirkung des hergestellten Silber-dotierten Hydroxylapatits, könnte seine Anwendung vor allem im medizinischen Bereich, insbesondere in der Chirurgie, von Interesse sein.



## **7 Literatur**

- [1] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3260.
- [2] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner, Wiesbaden, **2003**.
- [3] A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, *Bio-Med. Mater. Eng.* **2009**, *19*, 241.
- [4] M. Epple, K. Ganesan, R. Heumann, J. Klesing, A. Kovtun, S. Neumann, V. Sokolova, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 18.
- [5] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6144.
- [6] J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter, S. Gräfe, M. Epple, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2010**, *21*, 887.
- [7] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science* **2004**, *303*, 1818.
- [8] M. P. Ferraz, A. Y. Mateus, J. C. Sousa, F. J. Monteiro, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, *81A*, 994.
- [9] Y. X. Gao, S. H. Yu, H. P. Cong, J. Jiang, A. W. Xu, W. F. Dong, H. Cölfen, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2006**, *110*, 6432.
- [10] W. Wei, G. H. Ma, G. Hu, D. Yu, T. McLeish, Z. G. Su, Z. Y. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15808.
- [11] C.-L. Chen, N. L. Rosi, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2.
- [12] J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3831.
- [13] J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Gräfe, B. Gitter, M. Epple, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3324.
- [14] K. Ganesan, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2008**.
- [15] K. S. Oh, S. H. Park, Y. K. Jeong, *Euro Ceramics VIII* **2004**, 264-268, 2111.

- [16] N. Rameshbabu, T. S. S. Kumar, T. G. Prabhakar, V. S. Sastry, K. Murty, K. P. Rao, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, 80A, 581.
- [17] W. Chen, S. Oh, A. P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H. S. Courtney, M. Appleford, J. L. Ong, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, 82A, 899.
- [18] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Epple, M. Köller, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 347.
- [19] J. Y. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, R. H. Hurt, *ACS Nano* **2010**, 4, 6903.
- [20] S. Ahmad, R. A. Khakoo, *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, 14, E1115.
- [21] A. Almaguer-Flores, L. A. Ximenez-Fyvie, S. E. Rodil, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2010**, 92B, 196.
- [22] H. J. Busscher, M. Rinastiti, W. Siswomihardjo, H. C. van der Mei, *J. Dent. Res.* **2010**, 89, 657.
- [23] K. Subramani, R. E. Jung, A. Molenberg, C. H. F. Hammerle, *Int. J. Oral Max. Impl.* **2009**, 24, 616.
- [24] J. A. Waasdorp, C. I. Evian, M. Mandracchia, *J. Periodontol.* **2010**, 81, 801.
- [25] N. M. Bernthal, A. I. Stavrakis, F. Billi, J. S. Cho, T. J. Kremen, S. I. Simon, A. L. Cheung, G. A. Finerman, J. R. Lieberman, J. S. Adams, L. S. Miller, *PLoS One* **2010**, 5, e12580.
- [26] F. Rajewski, H. Grudniewicz, *Chir. Narzadow. Ruchu. Ortop. Pol.* **1997**, 62, 155.
- [27] P. Reinartz, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2009**, 53, 41.
- [28] C.-M. Huang, C.-H. Chen, D. Pornpattananankul, L. Zhang, M. Chan, M.-F. Hsieh, L. Zhang, *Biomaterials* **2011**, 32, 214.
- [29] S. Y. C. Tong, A. C. Steer, A. W. Jenney, J. R. Carapetis, *Dermatol. Clin.* **2011**, 29, 21.

- [30] E. Verkade, C. Verhulst, B. van Cleef, J. Kluytmans, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *30*, 109.
- [31] E. Bennett-Guerrero, T. N. Pappas, W. A. Koltun, J. W. Fleshman, M. Lin, J. Garg, D. B. Mark, J. E. Marcet, F. H. Remzi, V. V. George, K. Newland, G. R. Corey, S. T. Grp, *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1038.
- [32] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C. R. Arciola, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6363.
- [33] J. K. Smith, J. D. Bumgardner, H. S. Courtney, M. S. Smeltzer, W. O. Haggard, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2010**, *94B*, 203.
- [34] G. L. French, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *36*, S3.
- [35] K. Mallardo, S. Nizza, B. Facello, E. Pierni, E. Masturzo, U. Pagnini, G. Iovane, L. De Martino, *Ippologia* **2010**, *21*, 23.
- [36] S. M. F. Asmus, S. Sakakura, G. Pezzotti, *J. Compos. Mater.* **2003**, *37*, 2117.
- [37] J. W. Choi, H. M. Cho, E. K. Kwak, T. G. Kwon, H. M. Ryoo, Y. K. Jeong, K. S. Oh, H. I. Shin, *Bioceramics* **2004**, *254-2*, 47.
- [38] K. S. Hwang, S. Hwangbo, J. T. Kim, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 1337.
- [39] S. P. Valappil, D. M. Pickup, D. L. Carroll, C. K. Hope, J. Pratten, R. J. Newport, M. E. Smith, M. Wilson, J. C. Knowles, *Antimicrob. Agents. Ch.* **2007**, *51*, 4453.
- [40] H. Yang, B. J. Xiao, K. W. Xu, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20*, 785.
- [41] X. Zhang, G. H. M. Gubbels, R. A. Terpstra, R. Metselaar, *J. Mater. Sci.* **1997**, *32*, 235.
- [42] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, Berlin, **2002**.
- [43] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1362.
- [44] Malvern, *Zeta Potential and Introduction in 30 minutes*, Worcestershire, UK.

- [45] X. W. Lou, L. A. Archer, Z. C. Yang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3987.
- [46] H. L. Cong, M. F. Zhang, W. X. Cao, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 734.
- [47] R. Kumar, A. N. Maitra, P. K. Patanjali, P. Sharma, *Biomaterials* **2005**, *26*, 6743.
- [48] J. M. Han, D. S. Jung, S. H. Lee, Y. C. Kang, *J. Ceram. Process. Res.* **2008**, *9*, 140.
- [49] H. R. Zhang, C. M. Shen, S. T. Chen, Z. C. Xu, F. S. Liu, J. Q. Li, H. J. Gao, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 267.
- [50] A. L. Cui, X. M. Sun, Y. J. Dong, Y. D. Li, *Chin. J. Inorg. Chem.* **2001**, *17*, 518.
- [51] Q. G. Xu, Y. Tanaka, J. T. Czernuszka, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2687.
- [52] D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4472.
- [53] Y. R. Cai, H. H. Pan, X. R. Xu, Q. H. Hu, L. Li, R. K. Tang, *Chem. Mat.* **2007**, *19*, 3081.
- [54] Y. R. Cai, R. K. Tang, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3775.
- [55] B. G. Santoni, G. E. Pluhar, T. Motta, D. L. Wheeler, *Bio-Med. Mater. Eng.* **2007**, *17*, 277.
- [56] W. Tjandra, P. Ravi, J. Yao, K. C. Tam, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5988.
- [57] S. J. Son, X. Bai, S. B. Lee, *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 650.
- [58] Q. Wang, W. H. Huang, D. P. Wang, B. W. Darvell, D. E. Day, M. N. Rahaman, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2006**, *17*, 641.
- [59] T. Kawai, H. Sekikawa, H. Unuma, *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2009**, *117*, 340.
- [60] K. Kandori, Y. Noguchi, M. Fukusumi, Y. Morisada, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 6440.
- [61] T. Rehm, V. Stepanenko, X. Zhang, F. Wurthner, F. Gröhn, K. Klein, C. Schmuck, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1469.

- [62] F. Cuomo, F. Lopez, M. G. Miguel, B. Lindman, *Langmuir* **2010**, 26, 10555.
- [63] *CD Römpp Chemie Lexikon, Vol. 1*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart / New York, **1995**.
- [64] R. O. Brito, E. F. Marques, P. Gome, S. Falcao, O. Soderman, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 18158.
- [65] V. Sokolova, M. Eppele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1382.
- [66] P. W. Brown, B. Constantz, *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press, London Tokyo, **1994**.
- [67] T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Eppele, *Chem. Commun.* **2004**, 1204.
- [68] D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, M. Eppele, *Biomaterials* **2004**, 25, 3335.
- [69] D. Tadic, F. Peters, M. Eppele, *Biomaterials* **2002**, 23, 2553.
- [70] D. Tadic, A. Veresov, V. I. Putlayev, M. Eppele, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2003**, 34, 1048.
- [71] I. Gutowska, Z. Machoy, B. Machalinski, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2005**, 75A, 788.
- [72] A. Doat, F. Pelle, N. Gardant, A. Lebugle, *J. Solid State Chem.* **2004**, 177, 1179.
- [73] A. Lebugle, F. Pelle, C. Charvillat, I. Rousselot, J. Y. Chane-Ching, *Chem. Commun.* **2006**, 6, 606.
- [74] T. A. Fuierer, M. LoRe, S. A. Puckett, G. H. Nancollas, *Langmuir* **1994**, 12, 4721.
- [75] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, N. Roveri, *J. Inorg. Biochem.* **1993**, 49, 69.
- [76] M. Dalpi, E. Karayianni, P. G. Koutsoukos, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 6, 965.

- [77] I. R. Gibson, S. M. Best, W. Bonfield, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 44, 422.
- [78] N. Kanzaki, K. Onuma, G. Treboux, S. Tsutsumi, A. Ito, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 4189.
- [79] S. K. Arumugam, T. P. Sastry, B. Sreedhar, A. B. Mandal, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2007**, 80A, 391.
- [80] X. A. Bai, K. More, C. M. Rouleau, A. Rabiei, *Acta Biomater.* **2010**, 6, 2264.
- [81] L. Badrour, A. Sadel, M. Zahir, L. Kimakh, A. E. Hajbi, *Ann. Chim.-Sci. Mat.* **1998**, 23, 61.
- [82] J. A. Spadaro, S. E. Chase, D. A. Webster, *J. Biomed. Mater. Res.* **1986**, 20, 565.
- [83] S. Arens, M. Hansis, *Dtsch. Arztebl.* **1998**, 95, 32.
- [84] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie*, Springer, Berlin, **2000**.
- [85] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [86] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, **2000**.
- [87] F. Horn, I. Moc, N. Schneider, C. Grillhöse, S. Berghold, G. Lindenmeier, *Biochemie des Menschen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2005**.
- [88] R. Mai, R. Lux, P. Proff, G. Lauer, W. Pradel, H. Leonhardt, A. Reinstorf, M. Gelinsky, R. Jung, U. Eckelt, T. Gedrange, B. Stadlinger, *Biomed. Tech.* **2008**, 53, 229.
- [89] A. Reinstorf, U. Hempe, F. Olgemöller, H. Domaschke, W. Schneiders, R. Mai, B. Stadlinger, A. Rösen-Wolff, S. Rammelt, M. Gelinsky, W. Pompe, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* **2006**, 37, 491.
- [90] M. H. Klapper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 78, 1018.

- [91] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of laboratory chemicals*, Elsevier, Oxford, **2003**.
- [92] J. Ren, A. J. Davidoff, *Diabetes Metab. Res.* **2002**, *18*, 305.
- [93] H. Hori, H. Nagasawa, M. Ishibashi, Y. Uto, A. Hirata, K. Saijo, K. Ohkura, K. L. Kirk, Y. Uehara, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3257.
- [94] T. D. Singh, R. Shankar, *Int. J. Dev. Neurosci.* **1999**, *17*, 743.
- [95] M. Otto, *Analytische Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [96] P. S. Groodhew, F. S. Humphreys, *Elektronenmikroskopie: Grundlagen und Anwendung*, Mc Graw-Hill Book Company, London, **1988**.
- [97] D. B. Williams, C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*, Plenum Press, New York, **1996**.
- [98] H. Friedrich, P. M. Frederik, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7850.
- [99] R. H. Müller, R. Schuhmann, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1996**.
- [100] M. Stieß, *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*, Springer Verlag, Berlin, **2009**.
- [101] E. Koppel, *J. Chem. Phys* **1972**, 4814.
- [102] B. Carr, P. Hole, A. Malloy, P. Nelson, M. Wright, J. Smith, *Eur. J. Parenteral Pharm. Sci.* **2009**, *14*, 45.
- [103] NanoSight, LM10, & NTA, 2.0, *Analytical Software-Operating Manual*, NanoSight Ltd., Amesbury, **2009**.
- [104] NanoWizard®, *AFM Handbook*, JPK Instruments, **2005**.
- [105] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
- [106] T. Balgar, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2005**.
- [107] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.



- [108] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [109] G. Schwedt, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [110] P. F. Alewood, R. B. Johns, M. Robert, B. E. Bruce, *Synth.* **1983**, *1*, 30.
- [111] W. C. Oliver, G. M. Pharr, *J. Mater. Res.* **2004**, *19*, 3.
- [112] C. Song, T. Kwon, J.-H. Han, M. Shandell, M. S. Strano, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4279.
- [113] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of laboratory chemicals*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **2009**.
- [114] H. T. Schmidt, A. E. Ostafin, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 532.
- [115] H. T. Schmidt, B. L. Gray, P. A. Wingert, A. E. Ostafin, *Chem. Mat.* **2004**, *16*, 4942.
- [116] A. Bigi, E. Boanini, D. Walsh, S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2163.
- [117] A. Bigi, B. Bracci, S. Panzavolta, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2893.
- [118] A. Sumino, T. Dewa, M. Kondo, T. Morii, H. Hashimoto, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, *Langmuir* **2011**, *27*, 1092.
- [119] K. R. Rosholm, A. Gonzalez-Perez, O. G. Mouritsen, *Colloid. Polym. Sci.* **2010**, *288*, 1351.
- [120] K. D. Zhang, G. T. Wang, X. Zhao, X. K. Jiang, Z. T. Li, *Langmuir* **2010**, *26*, 6878.
- [121] C. Obermair, *Nanostrukturierung mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektrochemie*, Cuvillier Verlag, Göttingen, **2005**.
- [122] Z. Szakács, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, **2002**.
- [123] Z. Szakács, G. Hagele, *Talanta* **2004**, *62*, 819.
- [124] Z. Szakács, M. Kraszni, B. Noszal, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1428.

- [125] N. Amdursky, M. Molotskii, E. Gazit, G. Rosenman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15632.
- [126] C. A. E. Hauser, S. G. Zhang, *Nature* **2010**, *468*, 516.
- [127] G. M. L. Consoli, G. Granata, R. Lo Nigro, G. Malandrino, C. Geraci, *Langmuir* **2008**, *24*, 6194.
- [128] T. M. Hermans, M. A. C. Broeren, N. Gomopoulos, P. van der Schoot, M. H. P. van Genderen, N.A.J.M.Sommerdijk, G. Fytas, E. W. Meijer, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 721.
- [129] R. Matmour, I. de Cat, S. J. George, W. Adriaens, P. Leclere, P. H. H. Bomans, N. A. J. M. Sommerdijk, J. C. Gielen, P. C. M. Christianen, J. T. Heldens, J. C. M. van Hest, D. W. P. M. Lowik, S. de Feyter, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14576.
- [130] C. Pacholski, A. Kornowski, H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1188.
- [131] D. Kozlova, *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2010**.
- [132] M. Thomas, S. K. Ghosh, K. C. George, *Mater. Lett.* **2002**, *56*, 386.
- [133] S. Kittler, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Essen, **2009**.
- [134] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press LLC, Boca Raton, **2005**.
- [135] C. Greulich, S. Kittler, M. Epple, G. Muhr, M. Köller, *Langenbecks Arch. Surg.* **2009**, *394*, 495.
- [136] S. Schulz-Maronde, *Dissertation*, Universität Hannover, Hannover, **2003**.
- [137] R. Süßmuth, J. Eberspäche, R. Haag, W. Springer, *Mikrobiologischbiochemisches Praktikum*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [138] S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. van de Meent, S. Dekkers, W. H. De Jong, M.

- van Zijverden, A. J. A. M. Sips, R. E. Geertsma, *Nanotoxicology* **2009**, 3, 109.
- [139] S. Neumann, A. Kovtun, I. D. Dietze, M. Eppe, R. Heumann, *Bio-materials* **2009**.
- [140] J. Klesing, S. Chernousova, A. Kovtun, S. Neumann, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Heumann, M. Eppe, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 6144.
- [141] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, A. Hoshikawa, *J. Solid State Chem.* **2003**, 175, 272.
- [142] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Eppe, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 4548.

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>atomic force microscopy</i> )
Ala	L-Alanin
Ala-Tyr	Dipeptid Alanin-Serin
Boc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSP	<i>bone sialo-protein</i>
CaP	Calciumphosphat
CDHA	Calciumdefizitärer-Hydroxylapatit
DCPA	Dicalciumphosphat-anhydrit (Monetit)
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit)
DLS	Dynamische Lichtstreuung ( <i>dynamic light scattering</i> )
DLVO	Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Elementaranalyse
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ESI	Elektrosprayionisation
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
Gly	Glycin
HAP / HA	Hydroxylapatit
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
IP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot
k.a.	keine Angabe
Kryo-TEM	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie
MCPA	Monocalciumphosphat-Anhydrit

MCPM	Monocalciumphosphat-Monohydrat
mM	Millimolar (mmol L <sup>-1</sup> )
MS	Massenspektroskopie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> )
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OCP	Octacalciumphosphat
OPN	Osteopontin
PAS	<i>para</i> -Aminosalicylsäure
PDI	Polydispersitätsindex
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
Ser	L-Serin
SerP	<i>O</i> -Phospho-L-Serin
Ser-Tyr	Dipeptid Serin-Tyrosin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TG	Thermogravimetrie
TTCP	Tetracalciumphosphat
Tyr	L-Tyrosin
TyrP	<i>O</i> -Phospho-L-Tyrosin
UV	Ultraviolett
Vis	Sichtbar ( <i>visible</i> )
XRD	Röntgenpulverdiffraktometrie
α-TCP	α-Tricalciumphosphat
β-TCP	β-Tricalciumphosphat

## 9 Publikationsliste

### Referierte Publikationen

R. Detsch, D. Hagmeyer, M. Neumann, S. Schaefer, A. Vortkamp, M. Wuelling, G. Ziegler, M. Epple, *"The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclasts"*, Acta Biomaterialia (2010), 6, 3223-3233.

### Sonstige Publikationen

R. Detsch, M. Epple, D. Hagmeyer, M. Neumann, S. Schäfer, A. Vortkamp, M. Wülling, G. Ziegler, **"Die Reaktion von Osteoblasten und Osteoklasten auf nanokristalline Calciumphosphat-Keramiken"**, Biomaterialien (2009), 10, 106.

D. Hagmeyer, J. Ruesing, M. Epple, **"Die Selbstorganisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu Hohlstrukturen in Gegenwart von Aminosäuren"**, Biomaterialien (2010), 11, 173.

### Poster (P) und Vorträge (V)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V., 08.-10.10.2009, R. Detsch, M. Epple, D. Hagmeyer, M. Neumann, S. Schäfer, A. Vortkamp, M. Wülling, G. Ziegler, **"Die Reaktion von Osteoblasten und Osteoklasten auf nanokristalline Calciumphosphat-Keramiken"** in Tübingen (V)

Ukrainian-German Symposium on Nanoscience and Nanotechnology, 06.-10.09.2010, J. Ruesing, D. Hagmeyer, M. Epple **"The formation of calcium phosphate hollow spheres is induced by phosphorylated amino acids"** in Berehove, Krim, Ukraine (P)

Symposium "Molecular Bionics – From biomineralization to functional materials", 03.-06.10.2010, D. Hagmeyer, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, A. Dey, N.A.J.M. Sommerdijk, M. Epple, **"Hollow Spheres of calcium phosphate – Indication for a supramolecular organization of amino acids"**, in Ringberg / Tegernsee (V invited und P)

3<sup>rd</sup> IRUN Symposium on Nanotechnology, 14.-15.10.2010, D. Hagmeyer, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, A. Dey, N.A.J.M. Sommerdijk, M. Epple **"Self-assembly of calcium phosphate nanoparticles into hollow spheres in the presence of amino acids and dipeptides"** in Barcelona (V)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V., 2010 18.-20.11.2010, D. Hagmeyer, J. Ruesing, D. Schunk, C. Mayer, M. Epple **„Die Selbstorganisation von Calciumphosphat-Nanopartikeln zu Hohlstrukturen in Gegenwart von Aminosäuren"** im Heilbad Heiligenstadt (P)

Symposium on Supramolecular Chemistry , 24.-25.02.2011, D. Hagmeyer, J. Rüsing, M. Epple, **"The self-assembly of calcium phosphate hollow spheres as an indication for the supramolecular assembly of amino acids"** in Essen (P).

## **10 Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Name: Daniel Hagmeyer  
Geburtsdatum: 05.06.1979  
Geburtsort: Essen

### Schulbildung:

Grundschule	Aug. 1985- Juni 1989	Haferfeldschule
Realschule	Aug. 1989- Juni 1995	Franz-Dinnendahl-Schule
Berufsfachschule	Aug. 1995- Juni 1998	TBS 1 Bochum

### Schulabschluss:

Juni 1995	Realschulabschluss
Juni 1998	Fachhochschulreife
Juni 1998	Chemisch-Technischer-Assistent

### Studium der Chemie:

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität (Duisburg)-Essen
November 2003	Diplomvorprüfung
Juni 2007 – September 2007	Diplomprüfung
Oktober 2007 – März 2008	Diplomarbeit
Mai 2008 – März 2011	Promotion



## **11 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Calciumphosphat-Hohlpartikel als Indikator einer supramolekularen  
Selbstorganisation von Aminosäuren in Wasser**

**sowie die Herstellung von Silber-dotiertem Hydroxylapatit”**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im März 2011

## **12 Danksagung**

Ich danke:

Prof. Dr. Matthias Epple für die Überlassung der interessanten Themen, die gute Unterstützung, Diskussionen und Freiräume beim Anfertigen dieser Arbeit. Weiter danke ich ihm für die Ermöglichung meiner Forschungsaufenthalte in Pasadena, Eindhoven und Lissabon,

Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Koreferats,

Prof. Dr. M. da Piedade und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Lissabon für die freundliche Aufnahme und die dort durchgeführten Messungen und Berechnungen,

Prof. Dr. N.A.J.M. Sommerdijk und Dr. A. Dey von der Technischen Universität Eindhoven für die Anfertigung der Kryo-TEM und TEM-Bilder,

Prof. Dr. C. Mayer, Dr. D. Schunk und Dipl.-Chem. A. Zellermann für die AFM-Messungen,

Prof. Dr. C. Schmuck und Dipl.-Chem. T. Fenske für die AFM-Bilder der Aminosäurevesikel,

PD Dr. W. Schrader und H.-W. Klein vom Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim / Ruhr für die Erstellung der ESI-MS-Spektren,

Prof. Dr. B. Siebers und Dipl.-Biol. J. Kort für die Anfertigung der Bakterientests,

Dr. T. Schaller für Kraftfeldberechnungen der Aminosäuren,

Dipl.-Ing. D. Jacobi für die Anfertigung des Größenausschlusschromatogramms,

Dr. W. Meyer-Zaika für die Erstellung von TEM-Bildern,

## *Danksagung*

---

Dipl.-Ing. S. Boukercha für die Hilfe am Rasterelektronenmikroskop,

Dipl.-Ing. J. Gündel-Graber für die Hilfe bei den Messungen, sowie die Messung der Röntgenpulverdiffraktogramme,

Dr. O. Prymak für die Berechnung der Gitterparameter der Silber-dotierten Hydroxylapatit-Proben,

Dr. V. Sokolova und M. Sc. Biologie O. Rotan für die Anfertigung der Zelltests,

Ursula Giebel für die vielen kleinen Dinge, die immer hilfreich waren,

Frau Brauner und Frau Hiltenkamp aus der Mikroanalytik für die Anfertigung der Elementaranalysen,

M. Sc. Chem. J. Rüsing für die guten Ergebnisse aus seiner Vertiefungsarbeit und die Zuarbeit als studentische Hilfskraft,

B. Sc. Chem. T. Knoche für die Ergebnisse aus seiner Bachelorarbeit,

der Auszubildenden M. Kischkewitz für Zuarbeit bei der Herstellung des Silber-dotierten Hydroxylapatits,

Dipl.- Chem. J. Diendorf und M. Sc. Chem. J. Rüsing für die kritische Durchsicht dieser Arbeit,

den technischen Angestellten des AK Epple für die vielen Dinge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

den Mitarbeitern des AK Epple für die freundliche Aufnahme, die Beantwortung unzähliger Fragen und die Hilfe bei vielen kleinen Problemen,

Katrin Deppermann und Debbie Serres für die Durchsicht dieser Arbeit,

## *Danksagung*

---

meiner Freundin Christiane für die Unterstützung während der Promotionszeit und last but not least meinen Eltern für das Ermöglichen des Studiums, der Promotion und ihre Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.